

# O Laboratório no Diagnóstico Alergológico

**Jornadas de Actualização Diagnóstica em  
Dermatologia e Alergologia Veterinárias  
Évora, 30 de Abril a 2 de Maio de 2010**

Luís Martins  
Departamento de Medicina Veterinária  
Instituto de Ciências Agrárias e Ambientais Mediterrânicas  
Universidade de Évora



# Alergia

Reacção patológica no contacto com substâncias do meio ambiente que não provocam doença nos indivíduos normais.

Clemens Von Pirquet, 1906

# Atopia

Tendência de base genética, frequentemente hereditária, para produzir IgE com especificidade para diversos antígenos (alergénios) ambientais, resultando numa frequência acrescida de hipersensibilidade de tipo I.

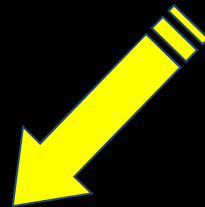
Thompson, 1995

Tendência individual ou familiar para produzir IgE em resposta a doses baixas de alergénios, normalmente proteínas, e desenvolver sintomas típicos como asma, rinoconjuntivite ou eczema/dermatite.

Johansson *et al.* - EAACI, 2001

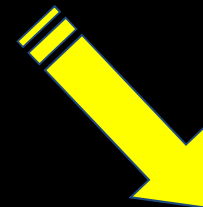
# Sensibilização

Produção de IgE após contacto com níveis inócuos de alérgenos ambientais



Reacção Clínica

**ALÉRGICO**



Sem Reacção Clínica

**NÃO ALÉRGICO**



Asma  
Rinite  
Conjuntivite  
Diarreia  
Vômitos  
Eczema  
Urticária

Não  
IgE

Estudo Etiológico

IgE

Tratamento

Farmacoterapia  
Outros

Evicção alérgica  
Imunoterapia  
Farmacoterapia

# Métodos Laboratoriais

## Imunidade Humoral

- IgE total
- IgE específicas
- ECP
- Western Blotting
- Microarrays e CRD

## Imunidade Celular

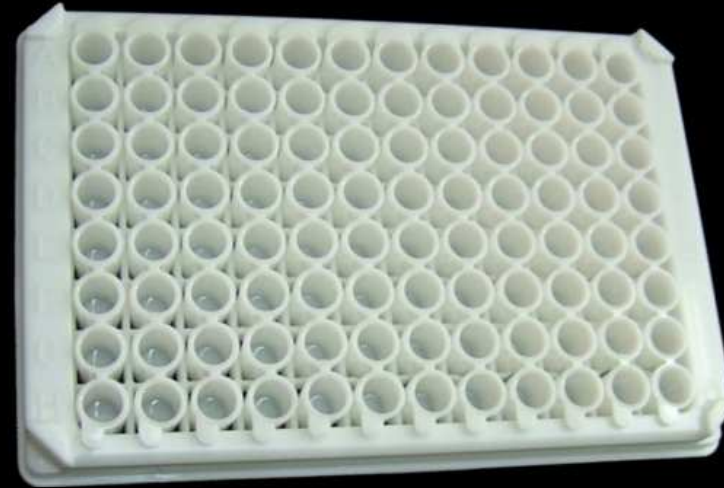
- Teste de libertação de histamina
- TTL
- Imunofenotipagem
- Teste de activação de basófilos

# Métodos Laboratoriais

## Imunidade Humoral

# IgE total

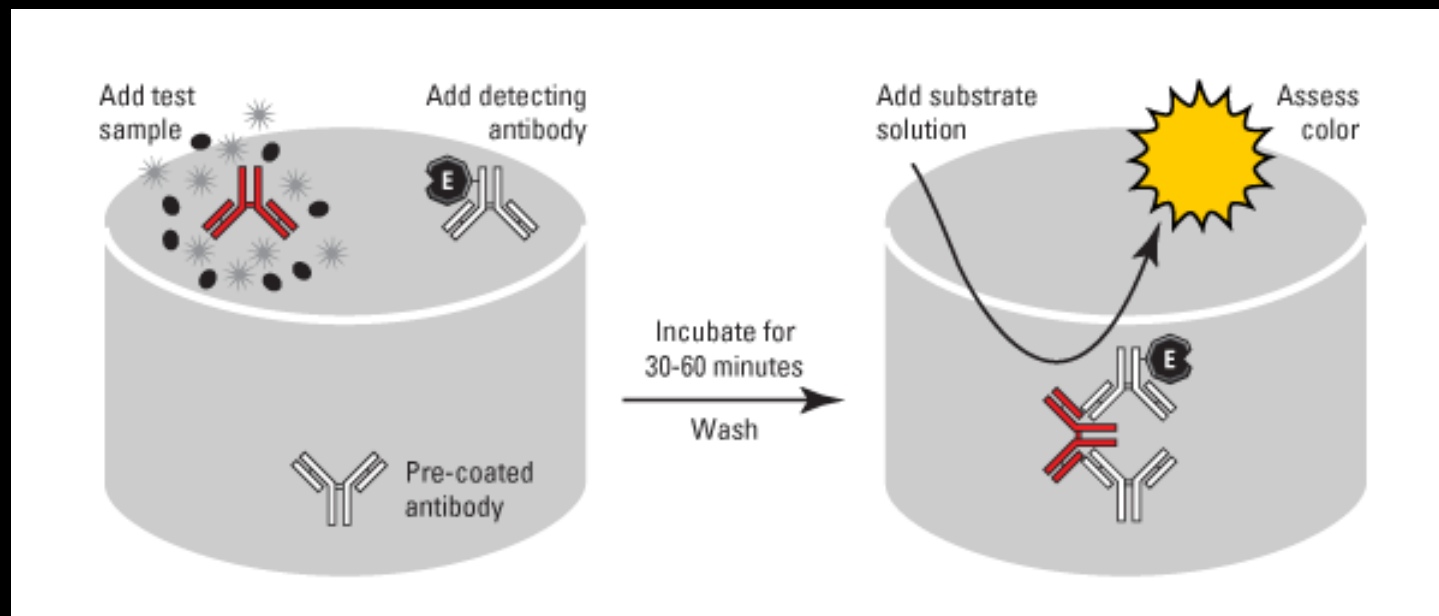
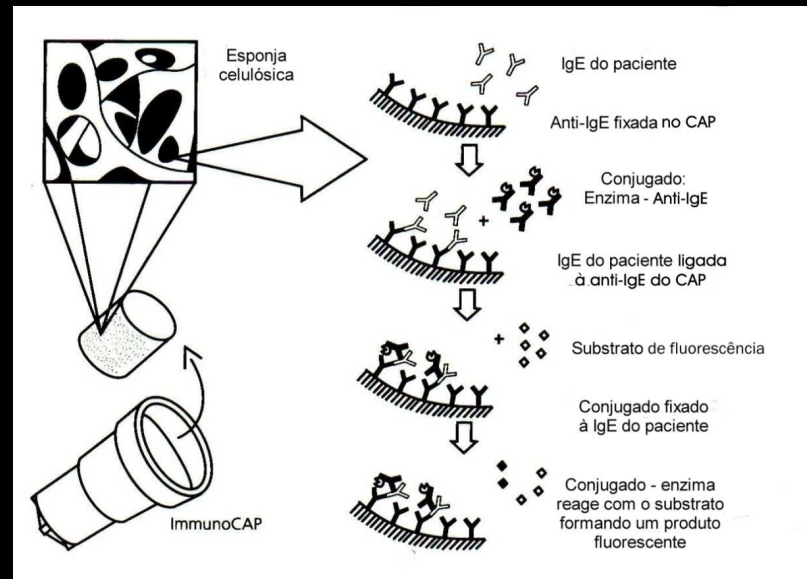
- ELISA





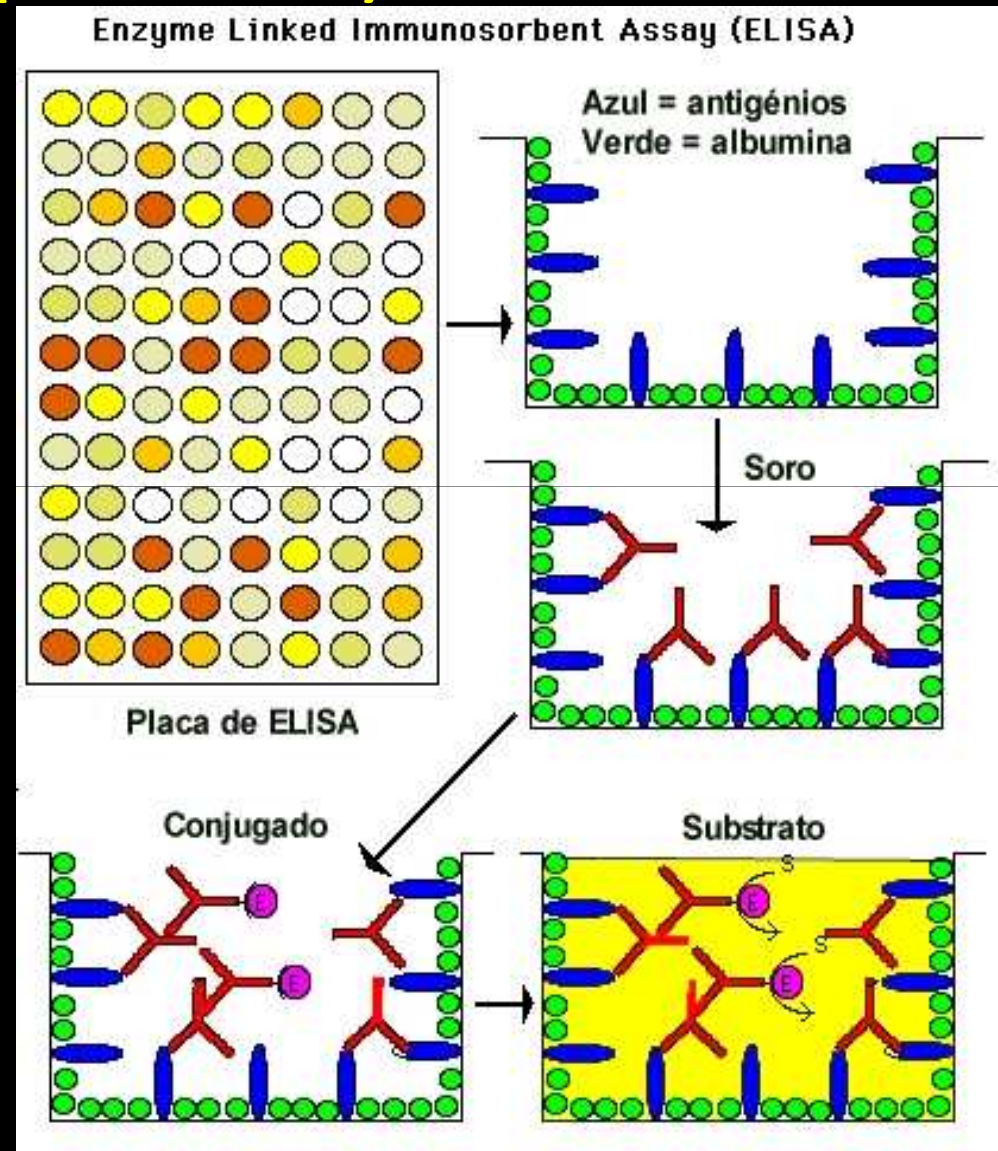
# IgE total

- Unicap<sup>®</sup>  
(Phadia)



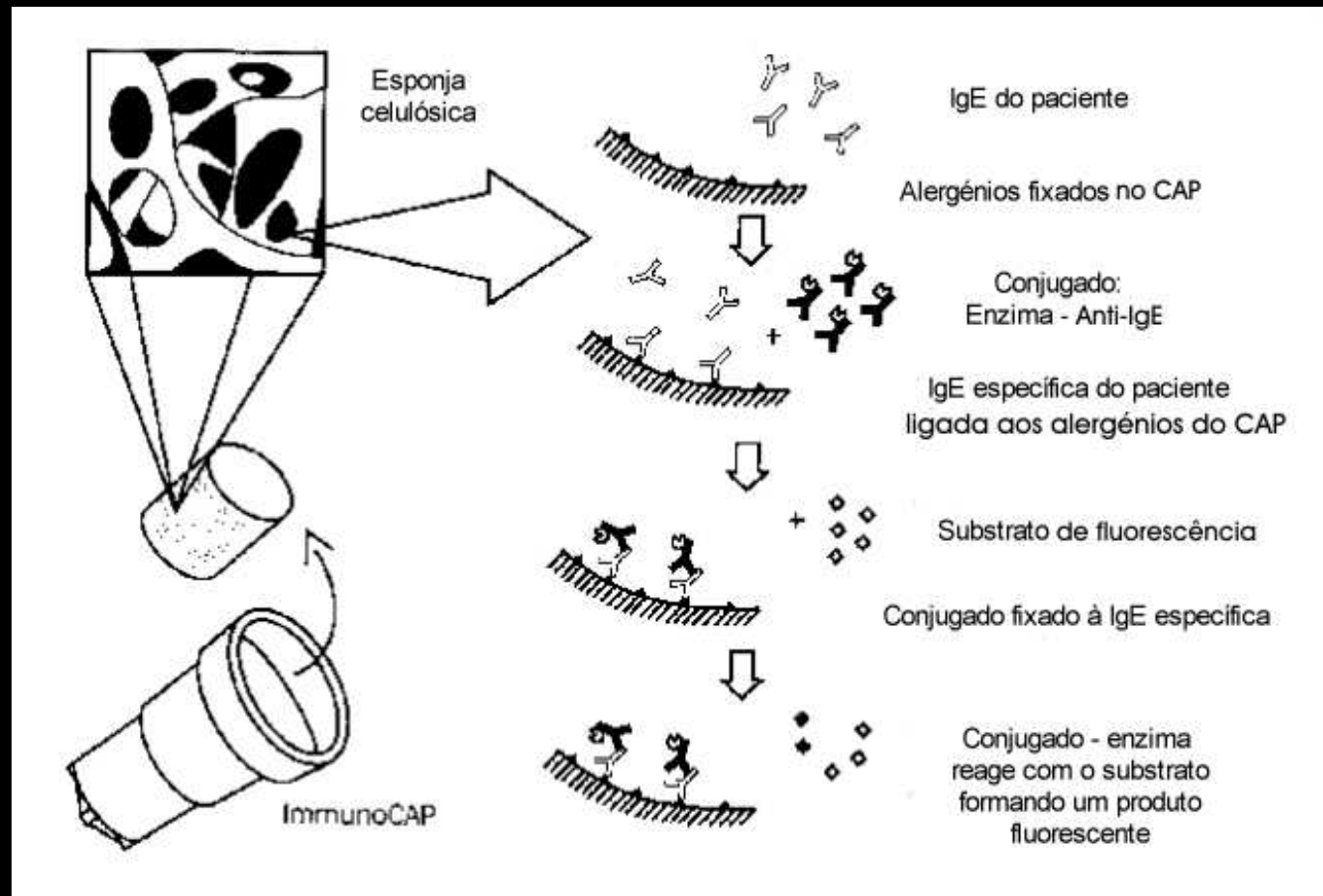
# IgE específicas (“RAST”)

- ELISA



# IgE específicas (“RAST”)

- Unicap®  
(Phadia)



# IgE específicas (“RAST”)

Classe IgE específica	kU <sub>A</sub> /l	Nível IgE específica
0	Inferior a 0,35	Ausente ou indetectável
1	0,35-0,69	Baixo
2	0,7-3,49	Moderado
3	3,5-17,49	Elevado
4	17,5-49	Muito elevado
5	50-99	Muito elevado
6	100 ou superior	Muito elevado

1U IgE = 2,4 ng

# ECP (Proteína catiónica dos eosinófilos)

- Mede a inflamação eosinofílica
- Reflete o efeito da medicação
- Permite calcular a mínima dose eficiente
- Permite seguir a aderência à terapêutica (compliance)
- Doseamento no **soro** e **secreções respiratórias**
- Método de **Radioimunoensaio** (detecção: 2 – 200 µg/L)

# ECP (Proteína catiónica dos eosinófilos)

- Útil no diagnóstico e acompanhamento de:

Processos inflamatórios obstrutivos das vias respiratórias

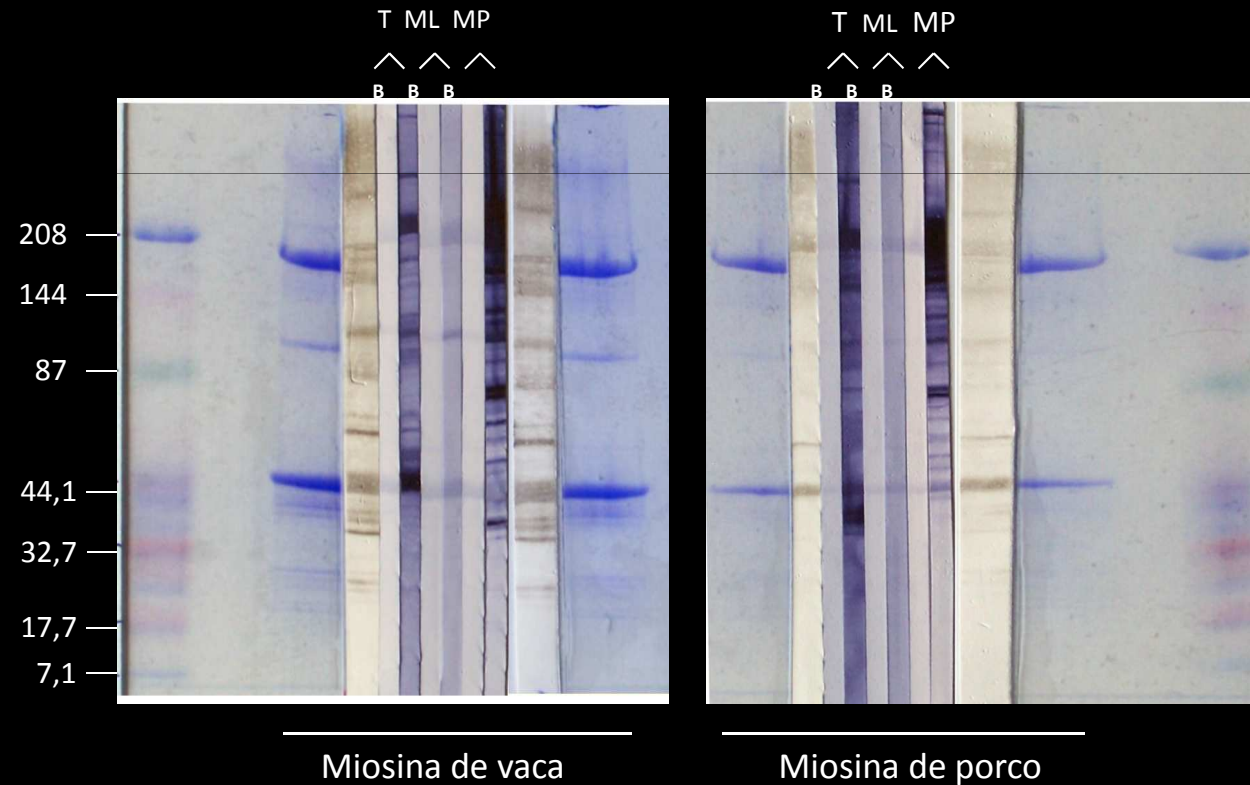
Rinite alérgica

Dermatite atópica



# Western Blotting ou Immunoblotting

- O que é?
- Para que serve?



# Western Blotting ou Immunoblotting

- Qual o procedimento?



# Western Blotting

- Objectivo:

**IDENTIFICAR e CARACTERIZAR ALERGÉNIOS**

**+**

**Obtenção de ALERGOGRAMAS e ESPECTROTIPOS**

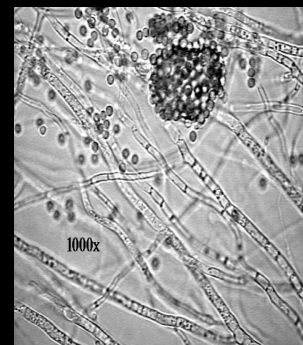
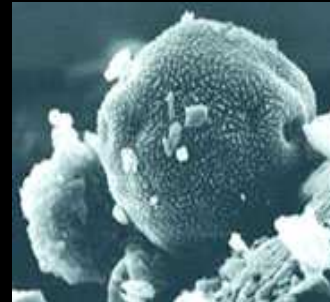
- Via:

**Apresentação das proteínas separadas ao reconhecimento pelas Ig**



# Western Blotting

- Fontes Alergénicas



# Western Blotting

- **Alergénios**

**Antigénios que induzem a produção de IgE**

**Em geral, proteínas com 3 a 80 kDa**

**Via de contacto ou sensibilização**

Pneumalergénios

Trofalergénios

de Contacto

# Western Blotting

- **Alergénios**

Fontes alergénicas conhecidas = 1736  
(acrécimo de cerca de 700 em 4 anos)

Fontes alergénicas com alergénios identificados = 753

Alergénios conhecidos, exc. isoformas e epitopos = 1779  
(acrécimo de cerca de 600 em 4 anos)

Isoformas conhecidas de alergénios = 1218



# Western Blotting

- **Alergénios**

Com PM ou pl próximos e homologia sequencial  $\geq 67\%$   
constituem **1 grupo**

Identificados **28 grupos** de alergénios, de acordo com a  
semelhança estrutural, independentemente da origem  
biológica

Klysner S, Lowenstein H. Allergen extracts and standardization. *In* Allergic Diseases.  
Kay AB (ed.). vol 2. Blacwell Science, 1997:825-834.

# Western Blotting

- **Alergénios**

**Nomenclatura** (ex.):

**Amb a 1.0101**  $\Rightarrow$  o alérgénio com maior taxa de reconhecimento da espécie *Ambrosia artemisiifolia* (Herbácea); subtipo 1 da isoforma 1

Chapman MD, Pomés A, Breiteneder H, Ferreira F. Nomenclature and structural biology of allergens. [J. Allergy Clin. Immunol.](#) 2007;[119\(2\)](#); 414-420.

**Der p 1**  $\Rightarrow$  o alérgénio com maior taxa de reconhecimento da espécie *Dermatophagoides pteronyssinus* (Ácaro)

**Taxa de reconhecimento** (pacientes):

**Major > 50% > Minor**

Klysner S, Lowenstein H. Allergen extracts and standardization. *In* Allergic Diseases. Kay AB (ed.). vol 2. Blackwell Science, 1997:825-834.

# Western Blotting

- Procedimento : a sequência
- 1º Obtenção das fontes alergénicas

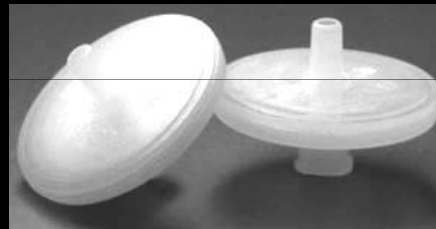


- 2º Extracção proteica



# Western Blotting

- Procedimento : a sequência
- 3º Padronização dos extractos  
Remoção de insolúveis



Ajuste da Concentração ao protocolo de separação



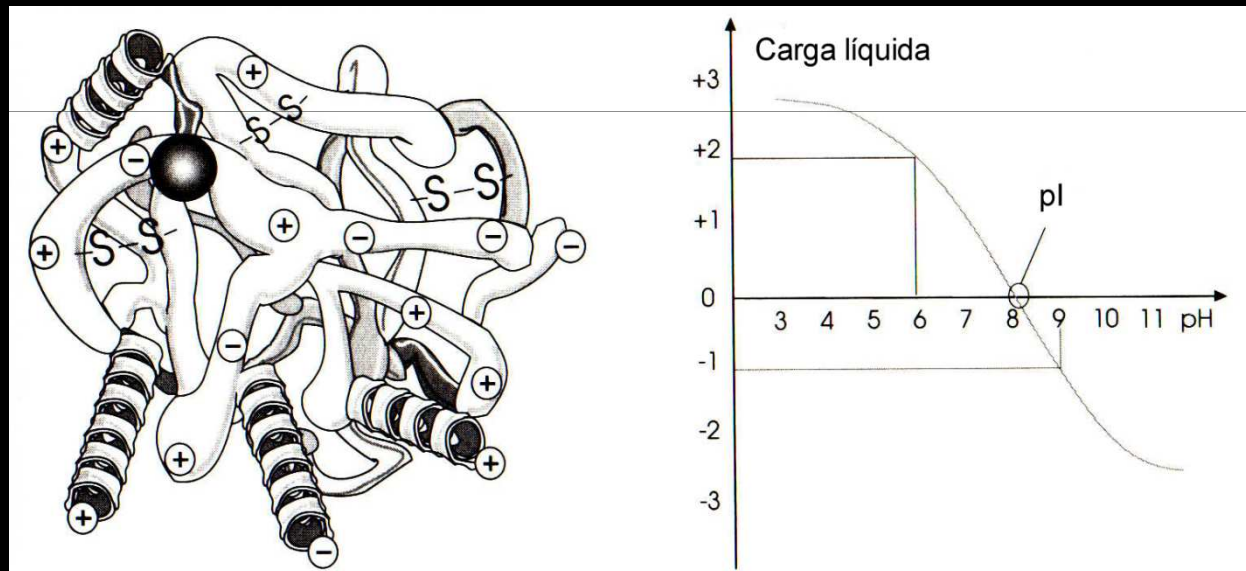
# Western Blotting

- Procedimento : a sequência
- 4º Separação das proteínas em gel, de acordo com:
  - i) Ponto Isoeléctrico (pI) → Isoelectrofocalização (IEF)
  - ii) Peso molecular → SDS PAGE
  - iii) pI + Peso molecular  $\Leftrightarrow$  IEF + SDS PAGE  
→ SDS PAGE bidimensional (2D)
  - iv) Reconhecimento dos alérgenos pelas IgE dos pacientes  
→ **Western Blotting**

# Western Blotting

- Procedimento : a sequência
- 4º Separação das proteínas em gel de acordo com
  - i) Ponto Isoelétrico (pI) → **Isoelectrofocalização (IEF)**

**Fundamento**



## **Influência do pH na carga líquida de uma molécula proteica.**

Esta proteína apresenta:

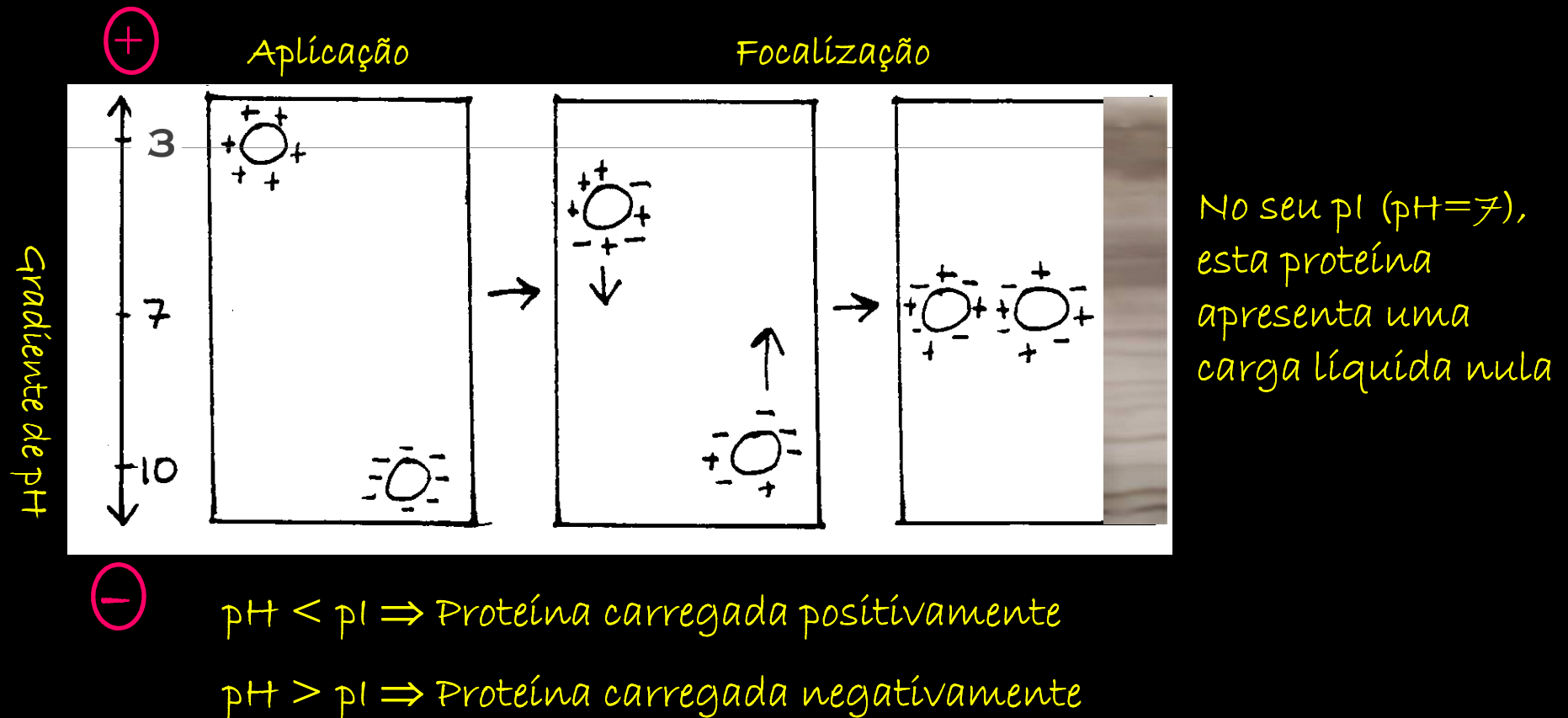
- predomínio de duas cargas positivas a pH = 6
- predomínio de uma carga negativa a pH = 9.
- equilíbrio de cargas positivas e negativas (**pI**) ocorre a pH = 8.



# Western Blotting

- Procedimento : a sequência
- Isoelectrofocalização (IEF)

Separação das proteínas em gel de gradiente de pH

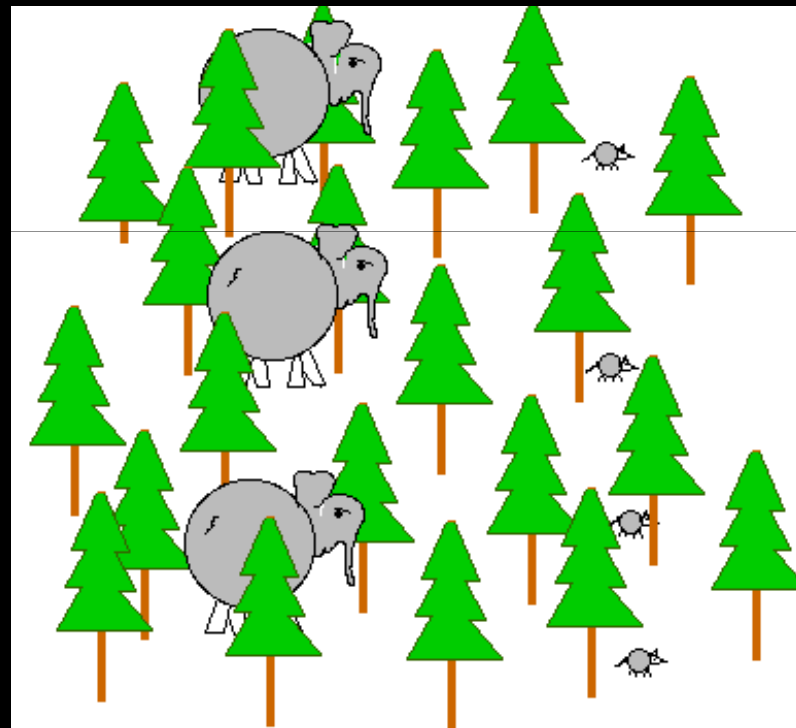


# Western Blotting

- Procedimento : a sequência

ii) Peso molecular → **SDS PAGE**

**Fundamento**

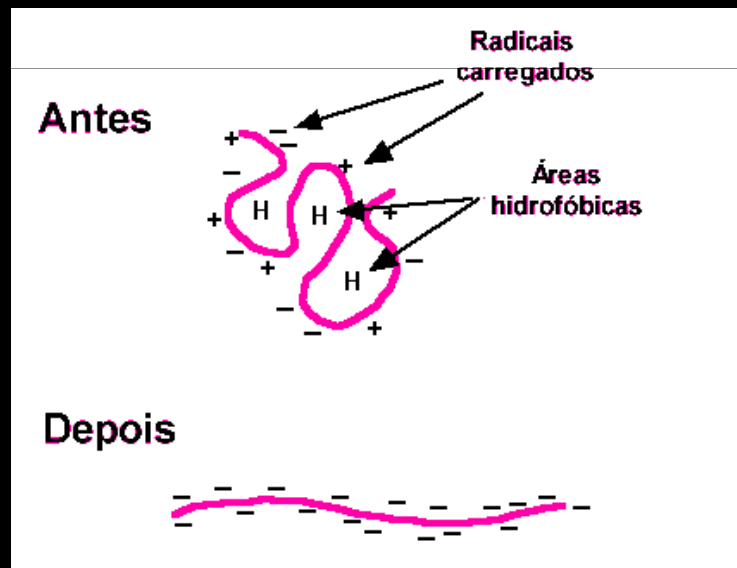


**Migração competitiva em gel**

# Western Blotting

- Procedimento : a sequência

## ii) Peso molecular → **SDS PAGE**



**Tratamento desnaturante prévio**

**Aplicação da amostra**

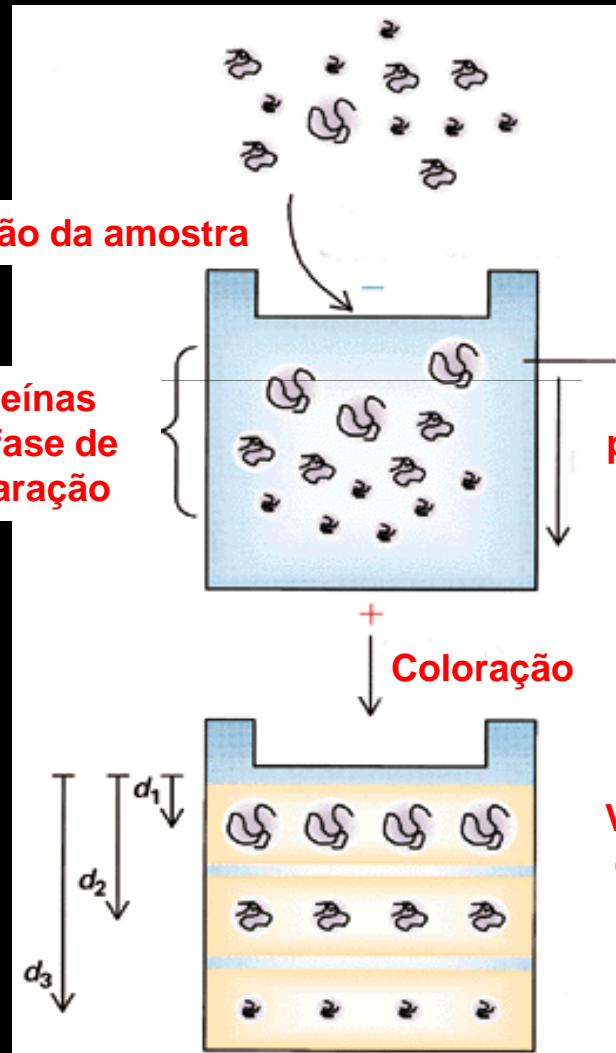
**Proteínas em fase de separação**

**Proteínas tratadas com SDS**

**Gel de poliacrilamida**

**Coloração**

**Visualização das bandas proteicas separadas**



# Western Blotting

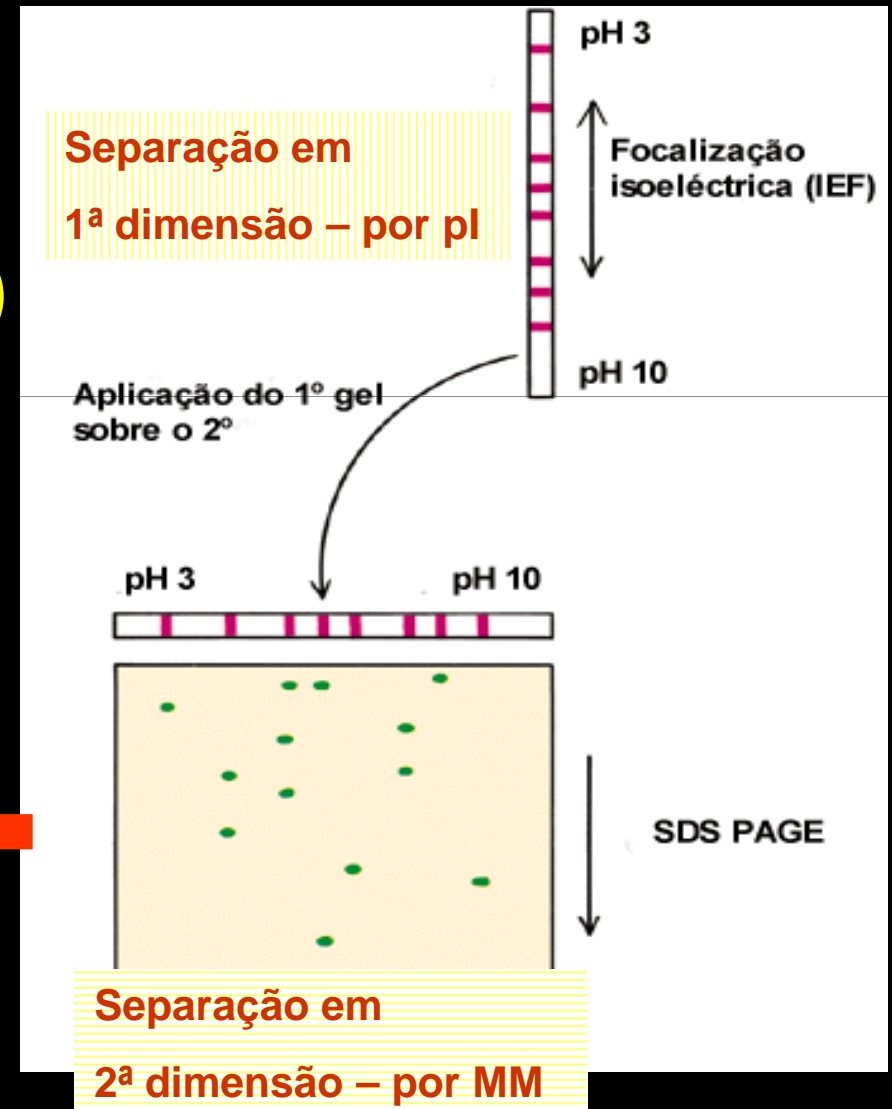
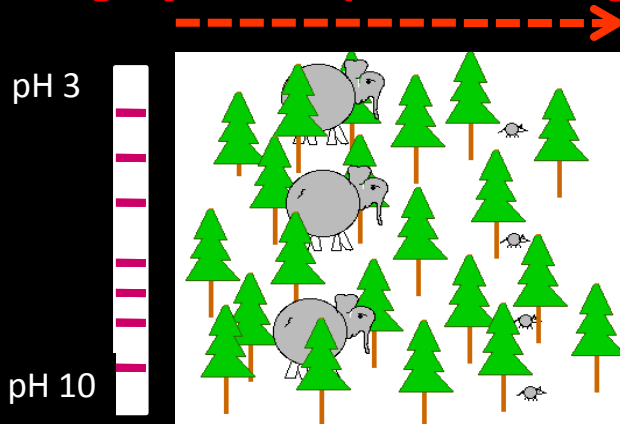
- Procedimento : a sequência

iii) pI + Massa molecular

⇔ IEF + SDS PAGE

**SDS PAGE bidimensional (2D)**

**Migração competitiva em gel**



# Western Blotting

- Procedimento : a sequência

iv) Reconhecimento dos alérgenos pelas IgE dos pacientes

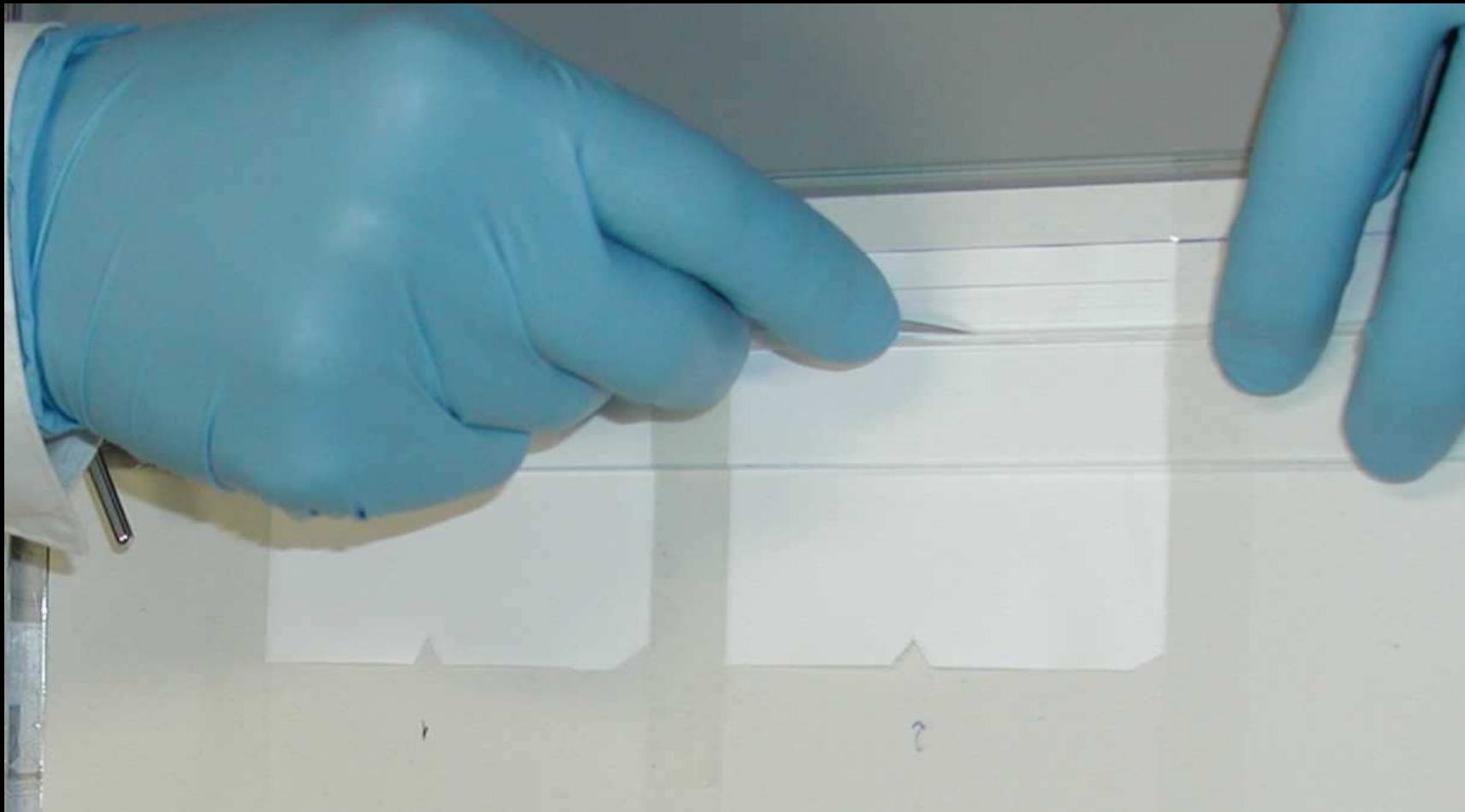
## Western Blotting

1. Transferência das proteínas separadas para membrana de fixação (Blot)
2. Imuno-reconhecimento (Western Blotting)
3. Identificação dos alérgenos por revelação das IgE reconhecedoras dos alérgenos separados

# Western Blotting

- Procedimento : a sequência

Corte da membrana de Blot em tiras perpendiculares à separação





# Western Blotting

- Procedimento : a sequência

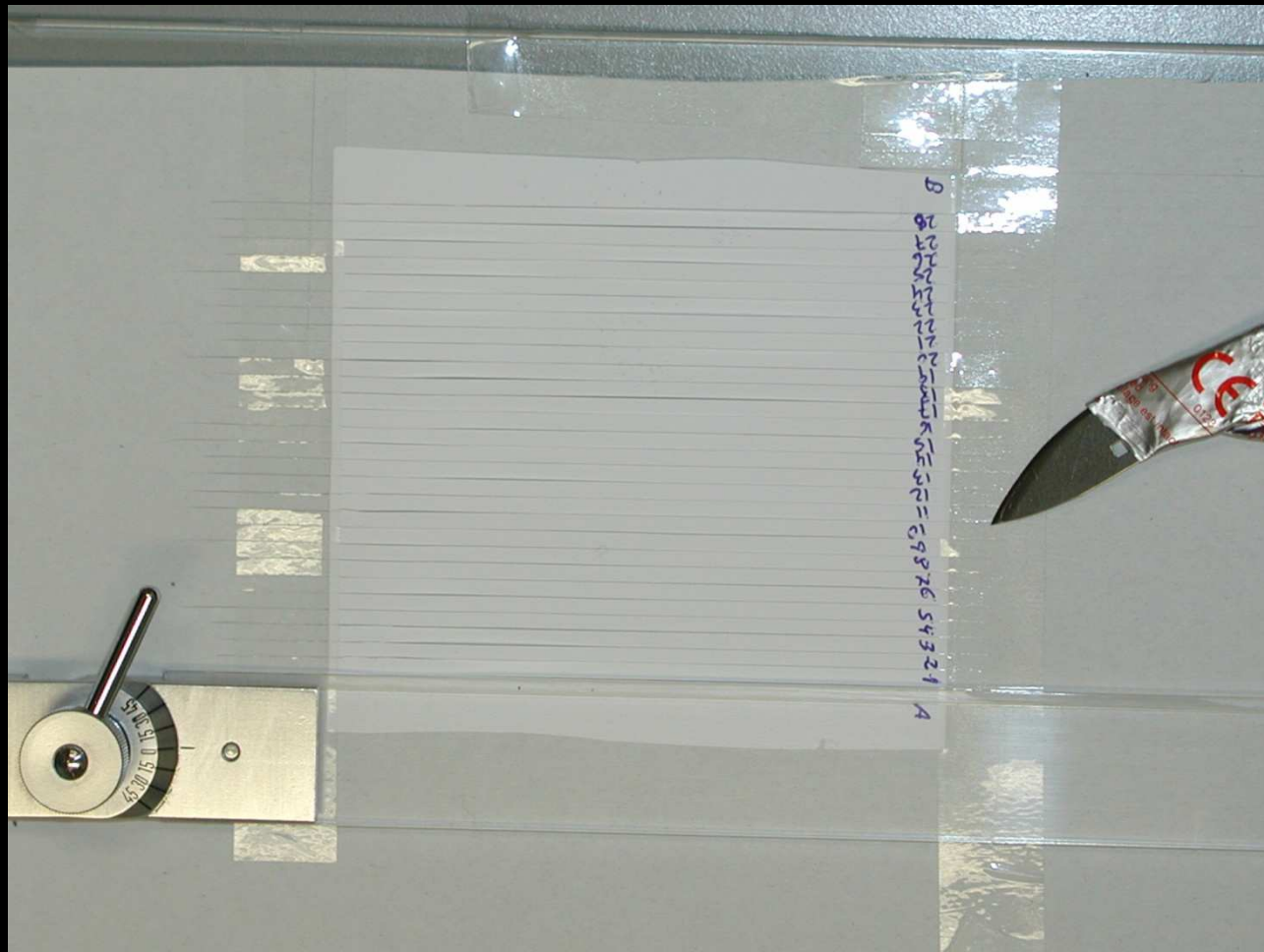
Numeração das tiras



# Western Blotting

- Procedimento : a sequência

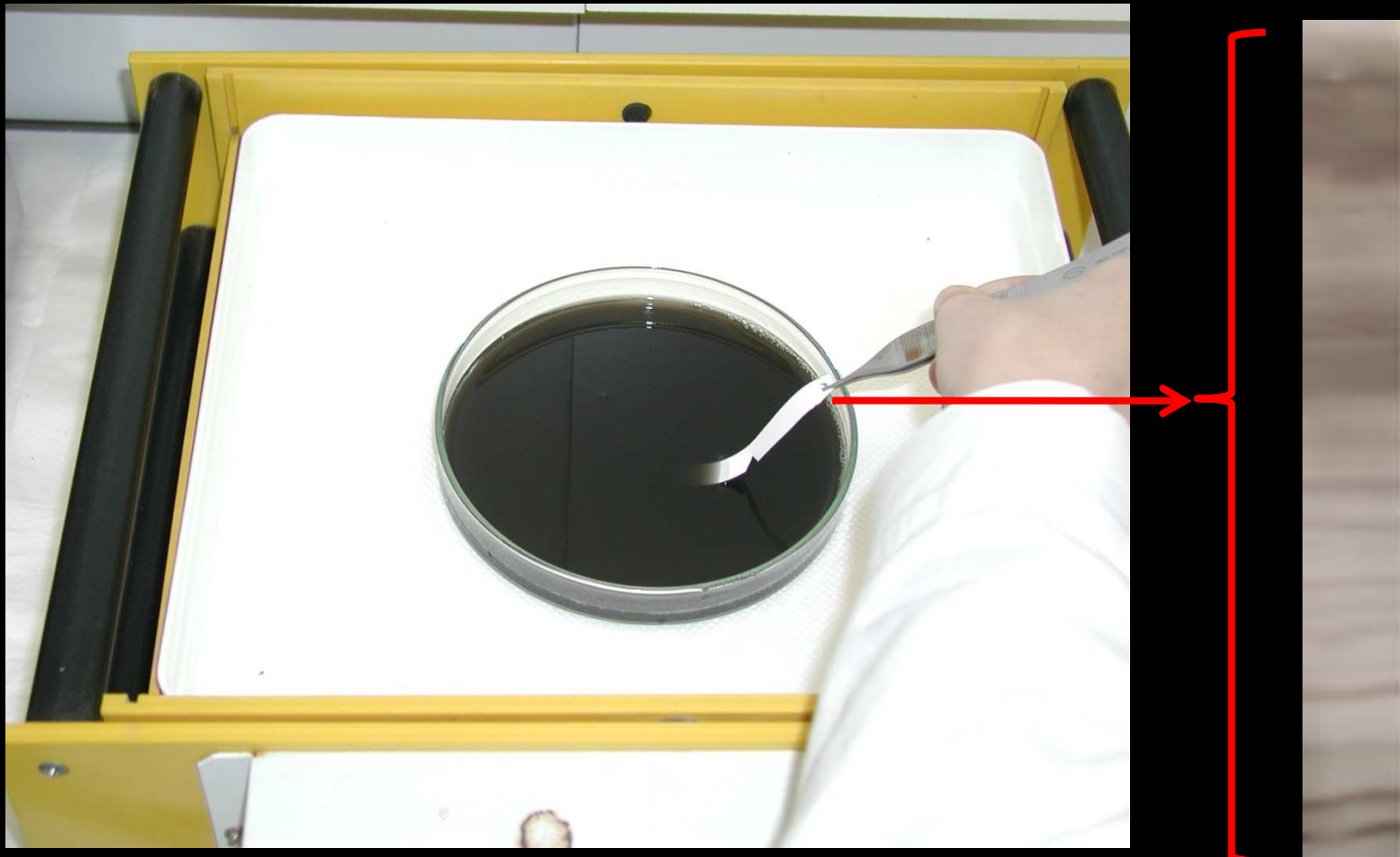
# Tiras numeradas



# Western Blotting

- Procedimento : a sequência

## Controlo da transferência



# Western Blotting

- Procedimento : a sequência

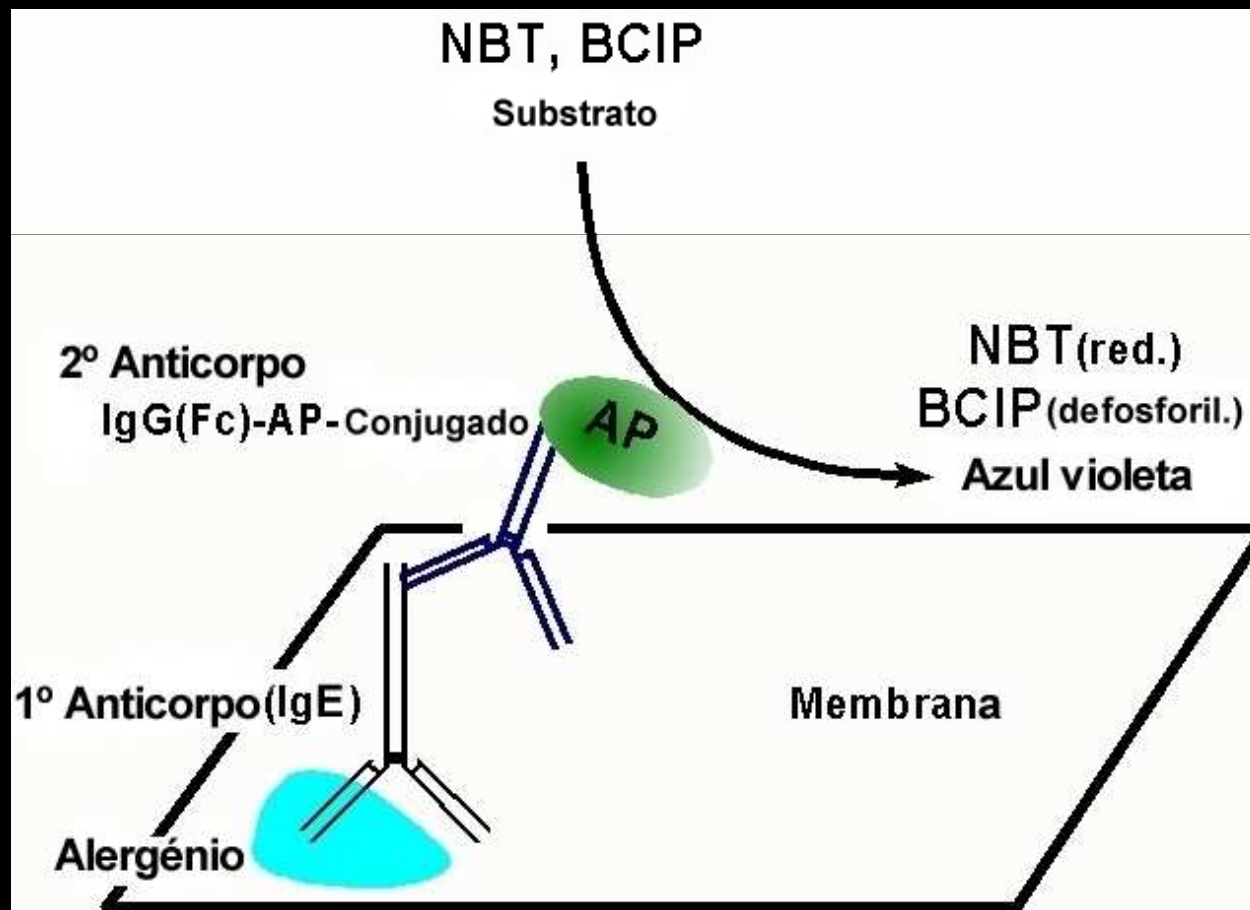
## Imuno-reconhecimento (Western Blotting)



# Western Blotting

- Procedimento : a sequência

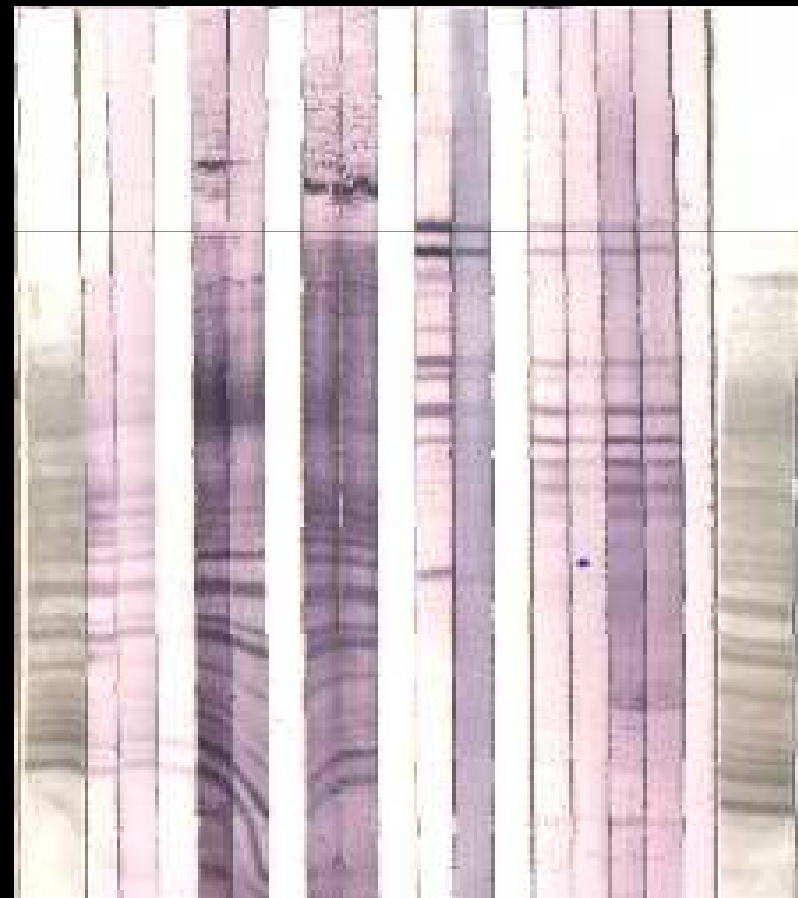
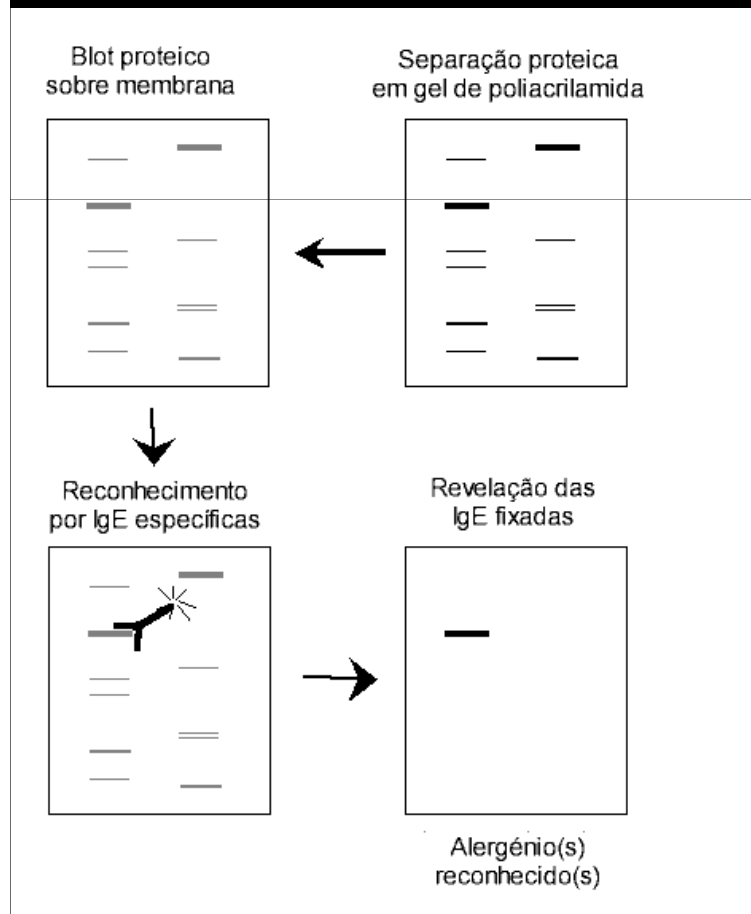
## Imuno-reconhecimento (Western Blotting)



# Western Blotting

- Procedimento : a sequência

## Imuno-reconhecimento (Western Blotting)

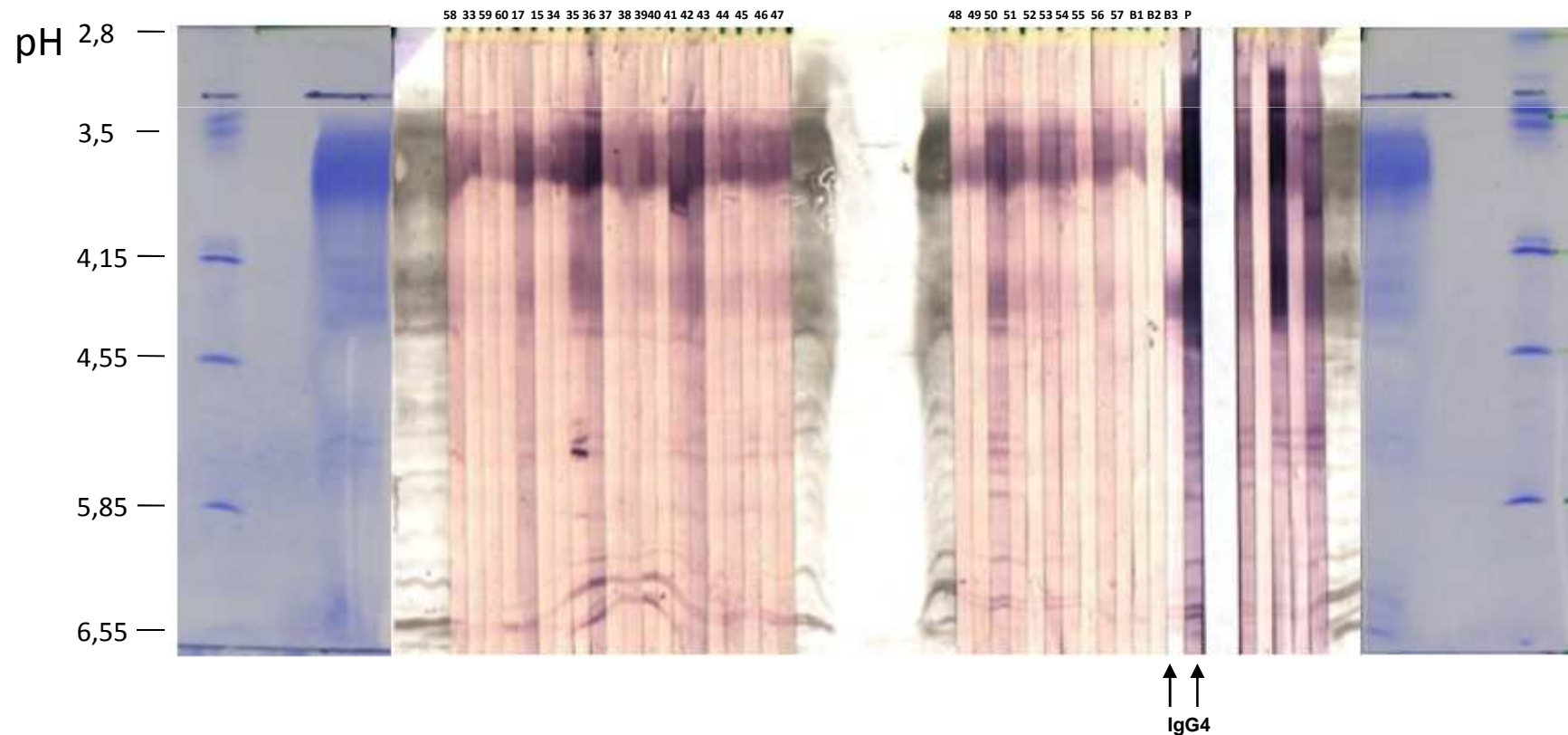




# Western Blotting

- Procedimento : a sequência

## Imuno-reconhecimento / Western Blotting – 1D (IEF)



# Western Blotting

- Procedimento : a sequência

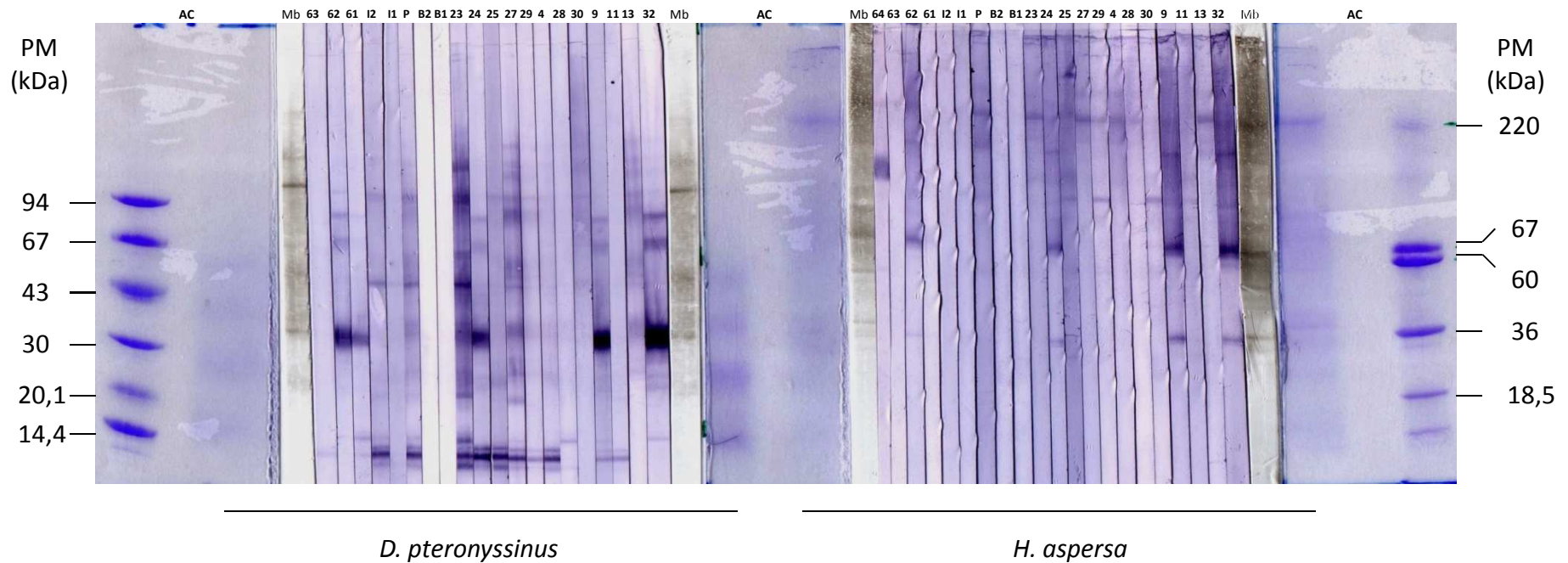
## Imuno-reconhecimento / Western Blotting – 1D (IEF)



# Western Blotting

- Procedimento : a sequência

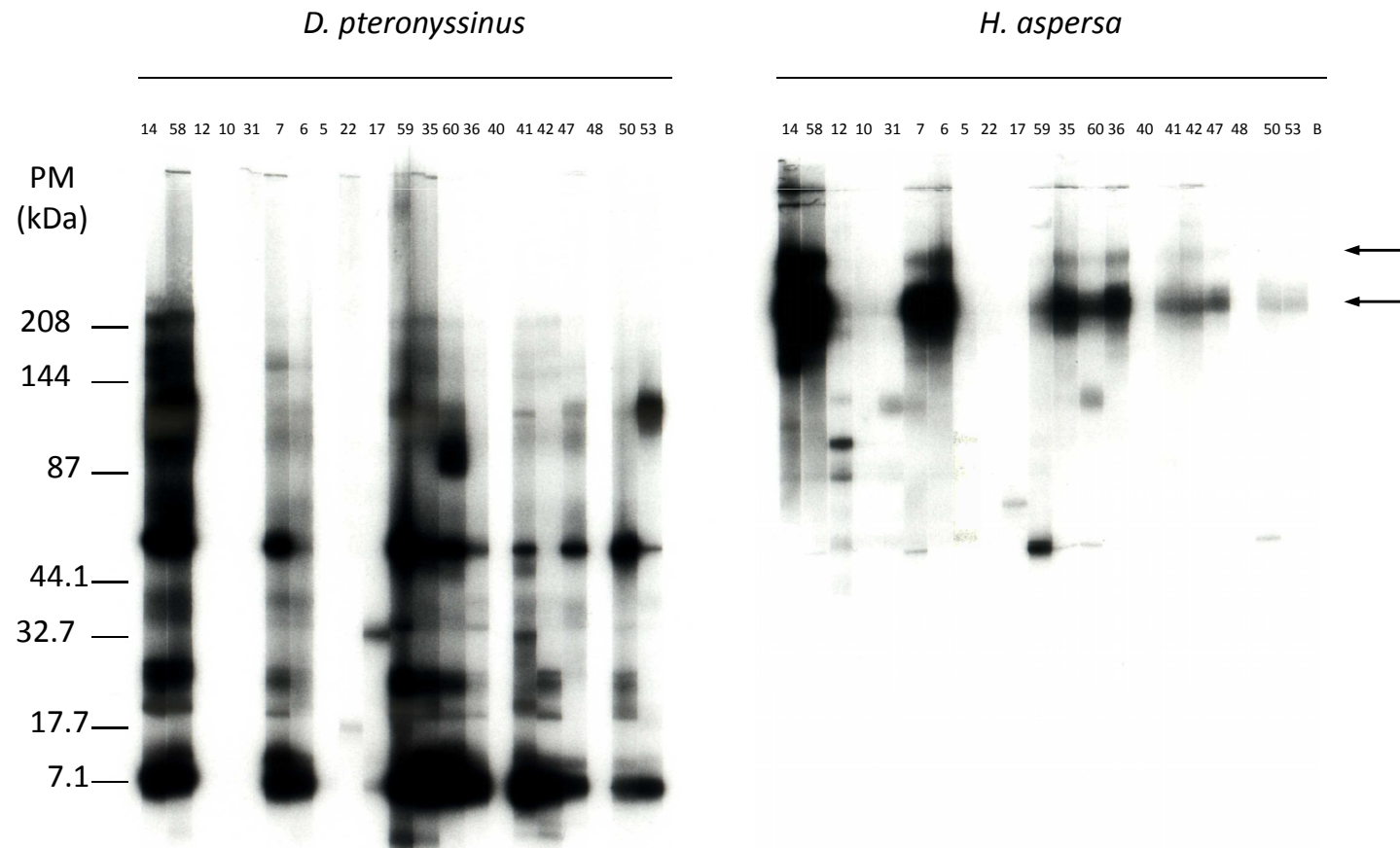
## Imuno-reconhecimento / Western Blotting – 1D (SDS PAGE)



# Western Blotting

- Procedimento : a sequência

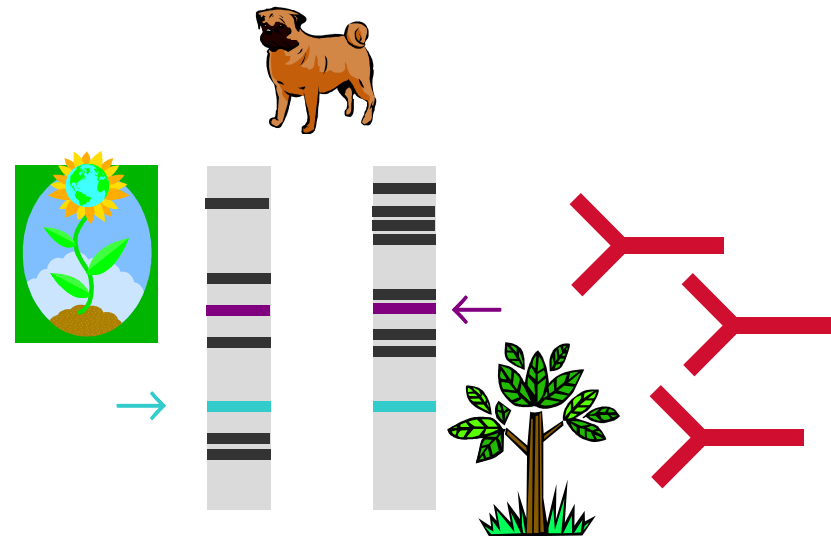
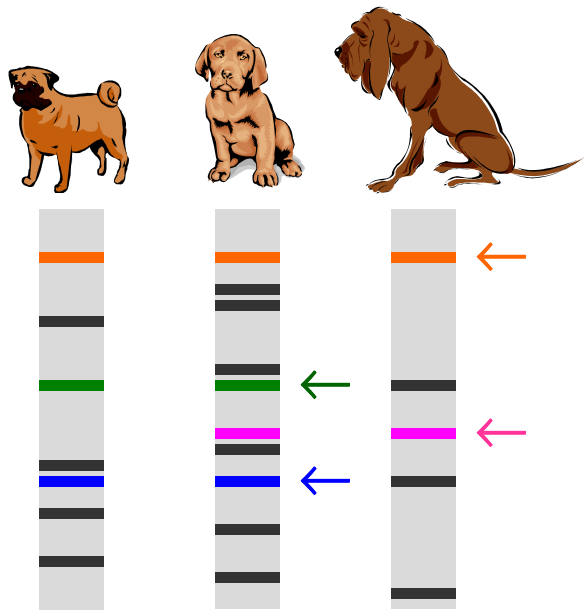
## Imuno-reconhecimento / Western Blotting – 1D (SDS PAGE)



# Western Blotting

## Imuno-reconhecimento / Western Blotting

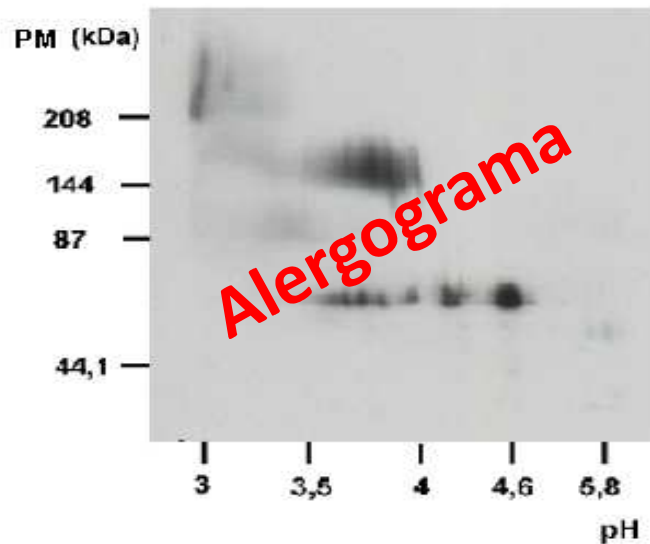
### Espectrotipos



# Western Blotting

## Imuno-reconhecimento / Western Blotting – 2D (IEF+SDS PAGE)

Western Blotting 2D



SDS  
PAGE  
1D



Separação 2D corada

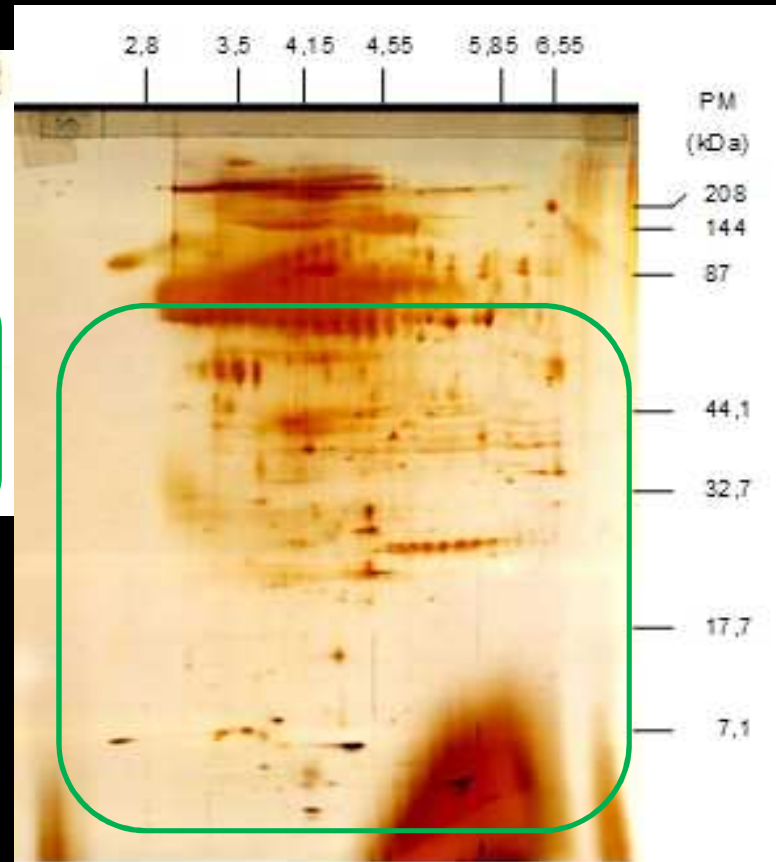
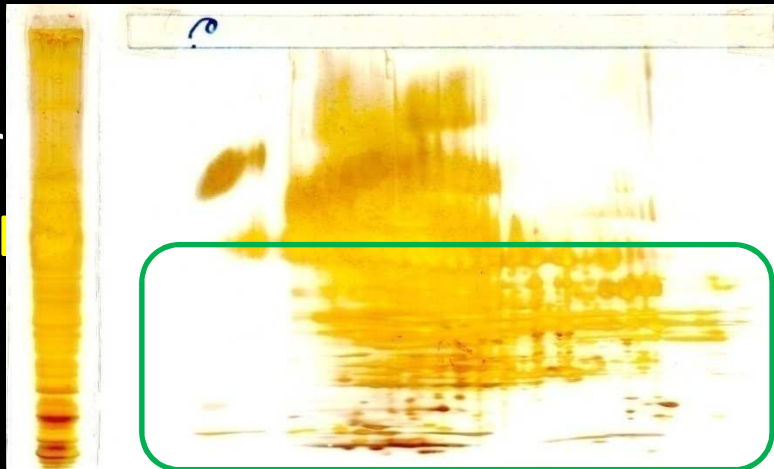




# Western Blotting

## Imuno-reconhecimento / Western Blotting – 2D (IEF+SDS PAGE)

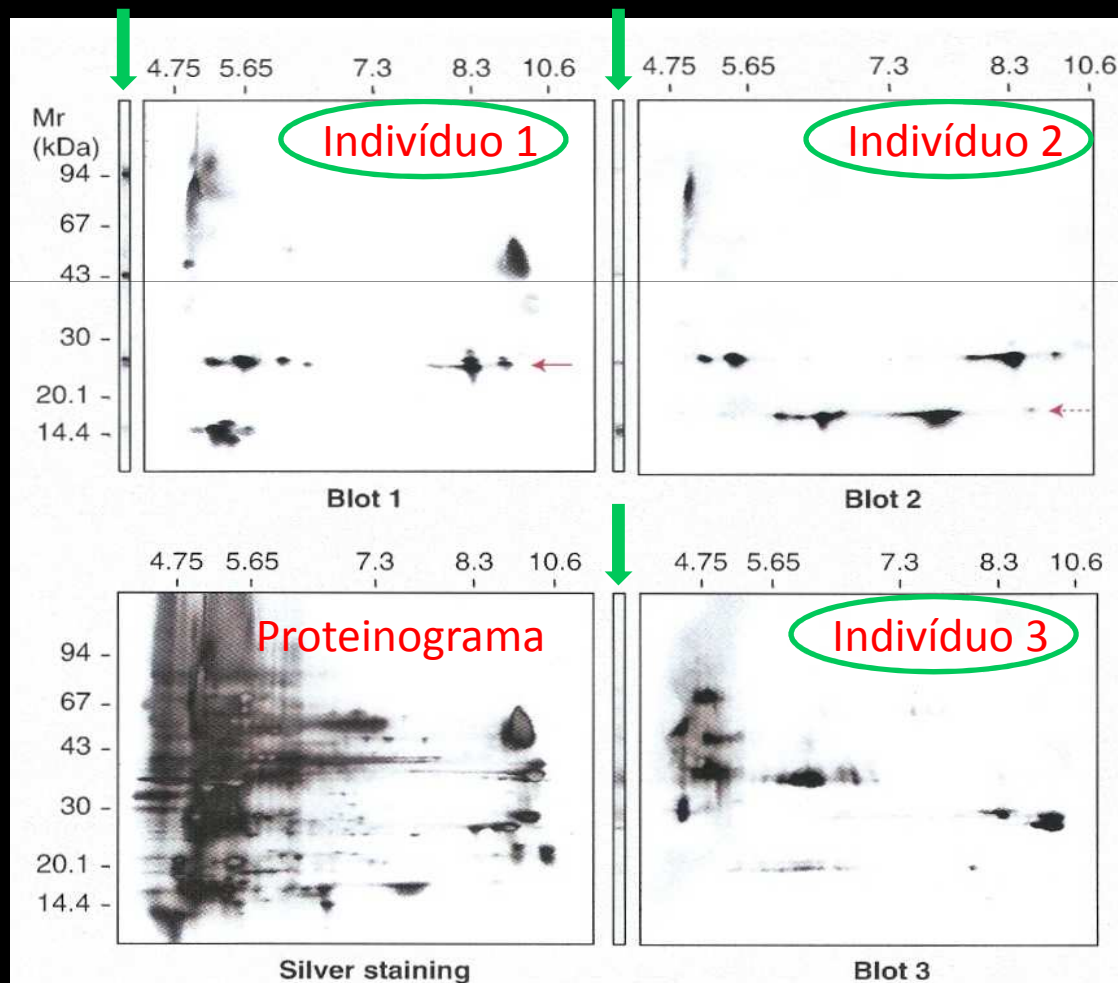
- Per
- I - I



# Western Blotting

Imuno-reconhecimento / Western Blotting – 2D (IEF+SDS PAGE)

## II - Diferenciar espectrotipos individuais próximos na 1D

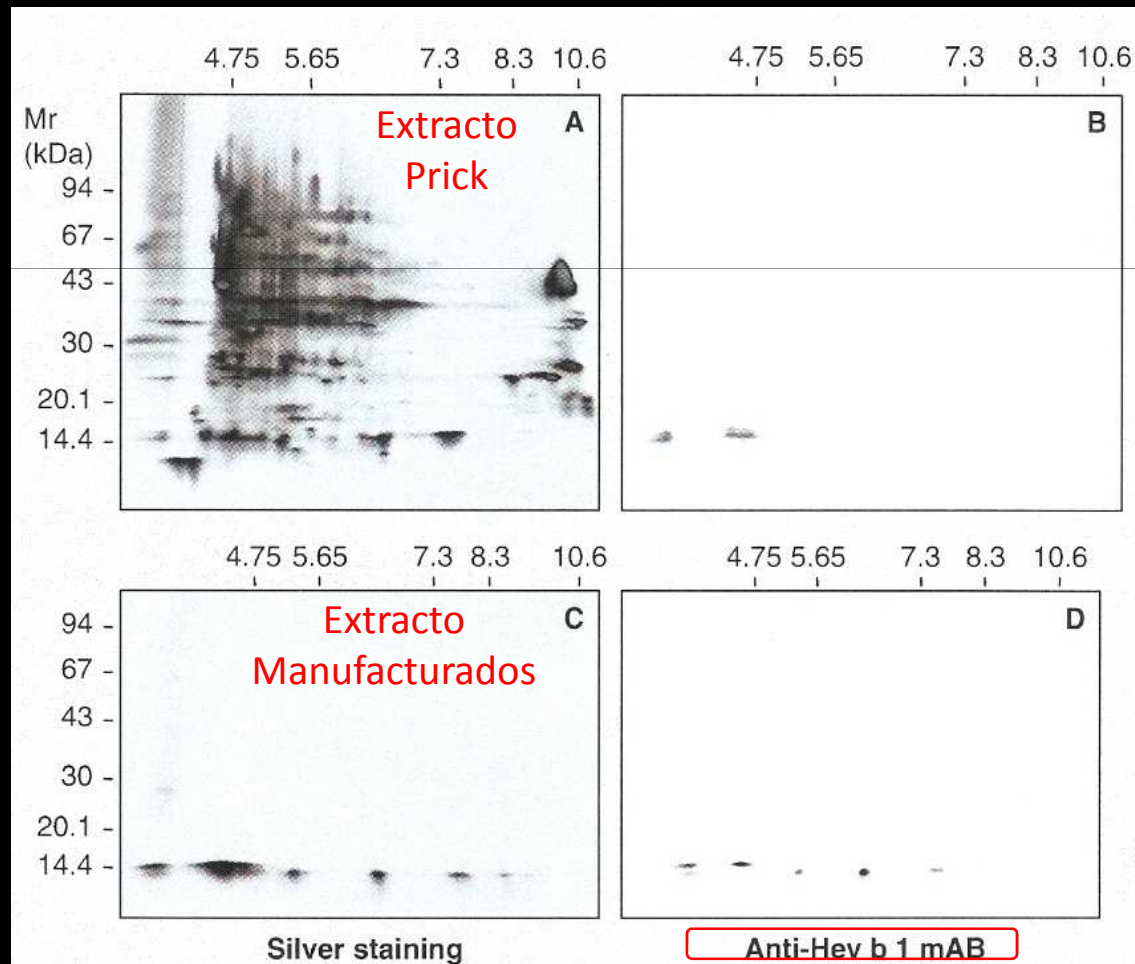


*In Allergome: the characterization of allergens based on a 2D gel electrophoresis approach. Chardin H, Peltre G. Expert Rev. Proteomics (2005) 2(5): 757-765.*

# Western Blotting

Imuno-reconhecimento / Western Blotting – 2D (IEF+SDS PAGE)

## III - Relacionar expressão de alérgenos com o estado da fonte



Chardin H, Peltre G. Allergome: the characterization of allergens based on a 2D gel electrophoresis approach. Expert Rev. Proteomics (2005) 2(5): 757-765.

# Western Blotting

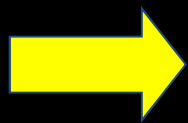
Imuno-reconhecimento / Western Blotting – 2D (IEF+SDS PAGE)

- IV - Melhorar consideravelmente a identificação da pequena porção do proteoma constituída pelos alérgenos
- V - Relacionar comportamentos clínicos com reconhecimento molecular
- VI - Aprofundar a necessária relação entre diagnóstico *in vitro* e *in vivo*
- VII - Contribuir para a utilização de imunoterapia mais dirigida e eficaz
- VIII - Evoluir para Micro- ou Nanotecnologias, no princípio do reconhecimento da diversidade alérgica intra-específica
- IX - Melhorar consideravelmente o diagnóstico alérgico, passo essencial para uma verdadeiramente eficaz terapia alérgico-específica

# Identificação de Reacções Cruzadas

- Sensibilização ao pó de alho  $\Rightarrow$  asma após ingestão
- Sensibilização a crustáceos por inalação dos vapores de cozedura  $\Rightarrow$  reacção anafiláctica após ingestão
- Sensibilização ao pólen do girassol  $\Rightarrow$  urticária após ingestão de mel de girassol
- Sensibilização ao ananás (bromelaína)  $\Rightarrow$  asma após ingestão
- Sensibilização a macrólidos (ex: espiramicina)  $\Rightarrow$  rinite após ingestão de ovos com resíduos

# Identificação de Reacções Cruzadas



Componentes antigénicas comuns  
entre fontes alergénicas diferentes

## Partilha de epitopos comuns

### Proximidade taxonómica

Diferentes espécies de:  
Vespas, abelhas, ácaros, crustáceos, caracóis

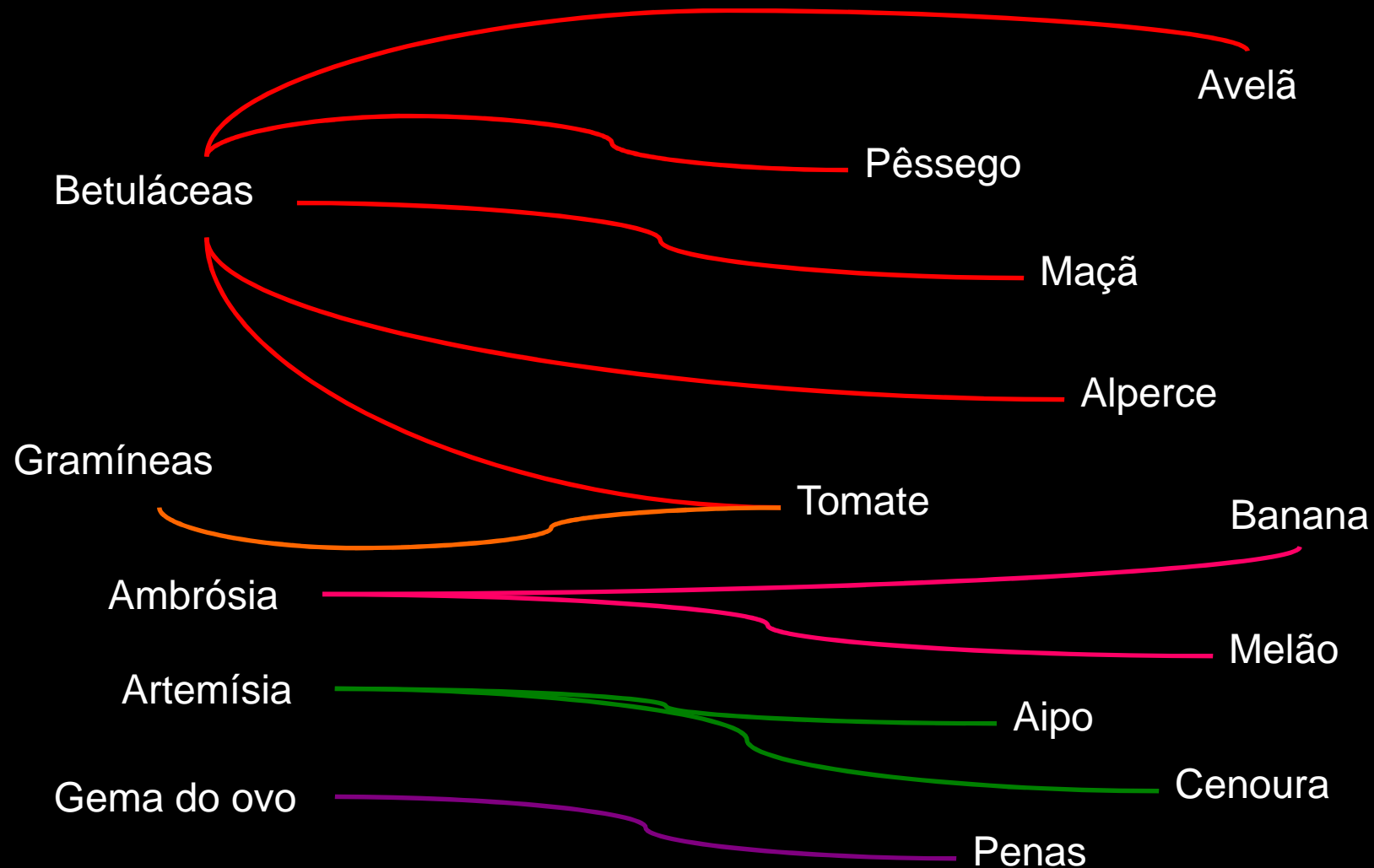
### Estruturas proteicas conservadas durante a evolução

Profilina: pólen da bétula / cenoura, batata, ...  
Actinidina: Kiwi, banana, papaia, noz, ... / látex  
Caracóis / ácaros



# Identificação de Reacções Cruzadas

Exemplos de epitopos comuns partilhados por alimentos e partículas inaladas, provenientes de fontes não relacionadas:



# Identificação de Reacções Cruzadas

Outras reacções cruzadas:

Com o látex

- Castanha
- Espinafres
- Kiwi
- Noz
- Banana
- Melão

Com ácaros

- Caracóis

Entre diversas espécies de

- Caracóis
- Crustáceos

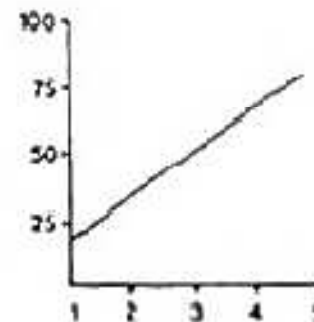
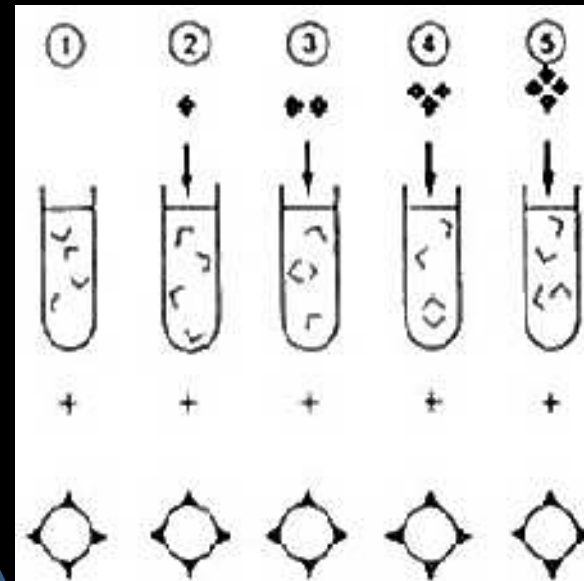
Entre amendoim e tremoço

# Identificação de Reacções Cruzadas

**1º** Incubação prévia dos soros a testar com o **extracto da fonte alergénica A** (Inibidora)

**2º** RAST de Inibição com a **fonte alergénica B**

**Inibição do RAST**



**Extracto inibidor da fonte A**  
em concentrações crescentes

+

Soro do animal alérgico

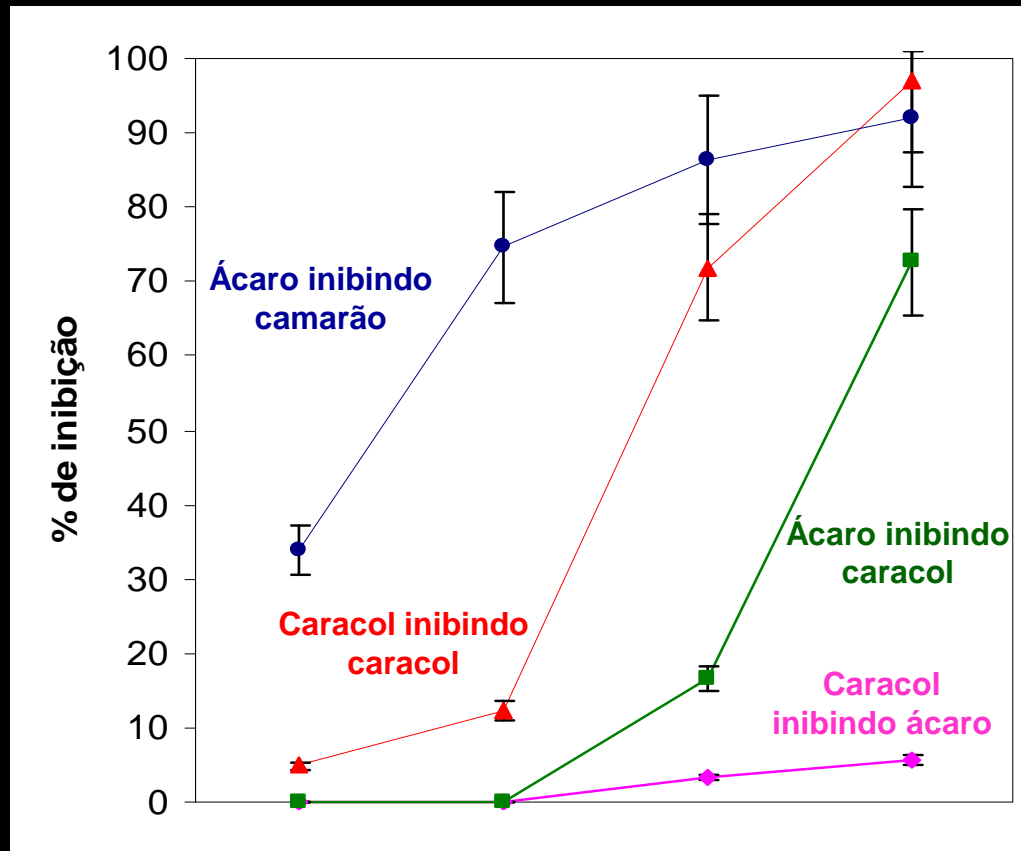


**RAST para a fonte B**

Gráfico de inibição

# Identificação de Reacções Cruzadas

Exemplos práticos:

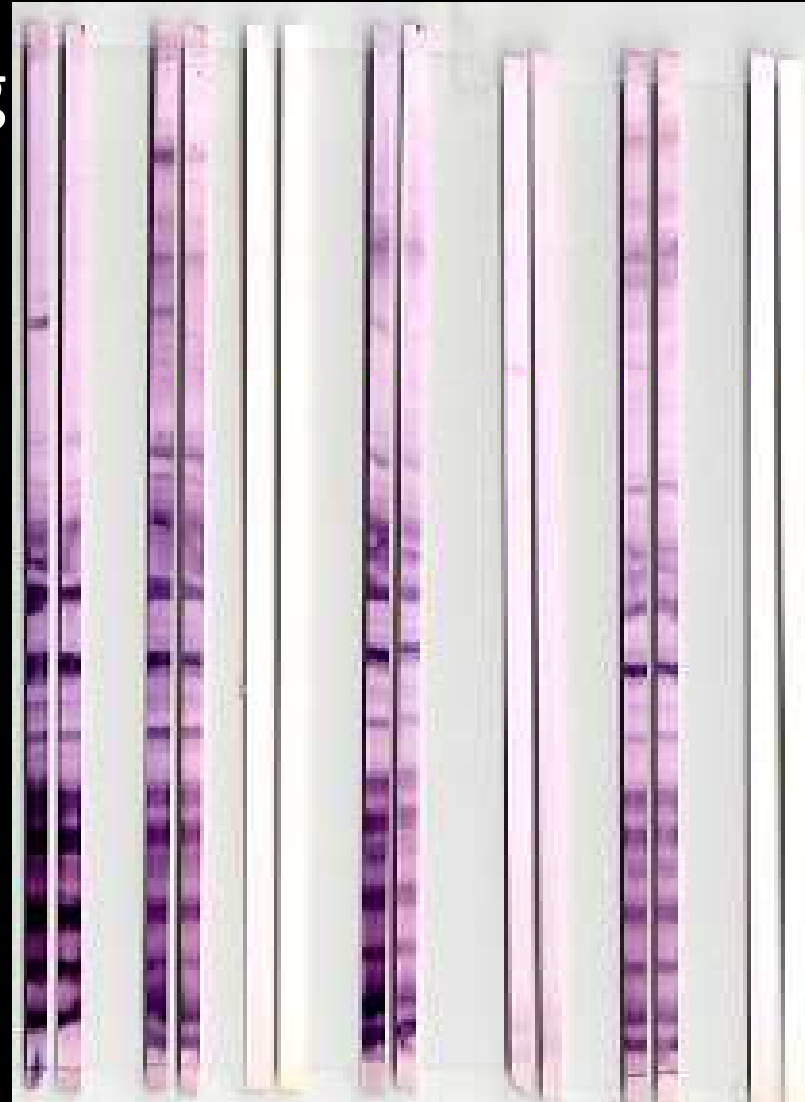


# Identificação de Reacções Cruzadas

... Inibição do W. Blotting

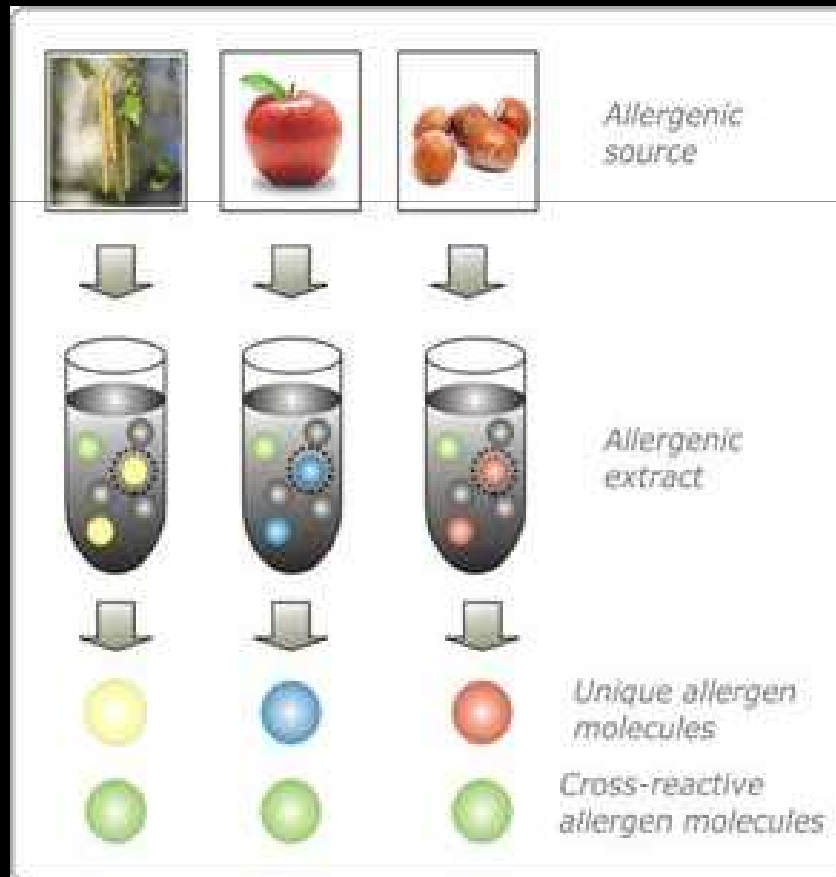
Inibição do W. Blotting  
do *Phl p* pela *Bet v*

Inibição do *Kiwi* pelo *Phl p*



# Microarrays e CRD

- **ISAC** (Immuno Solid-phase Allergy Chip) – Phadia, Suécia



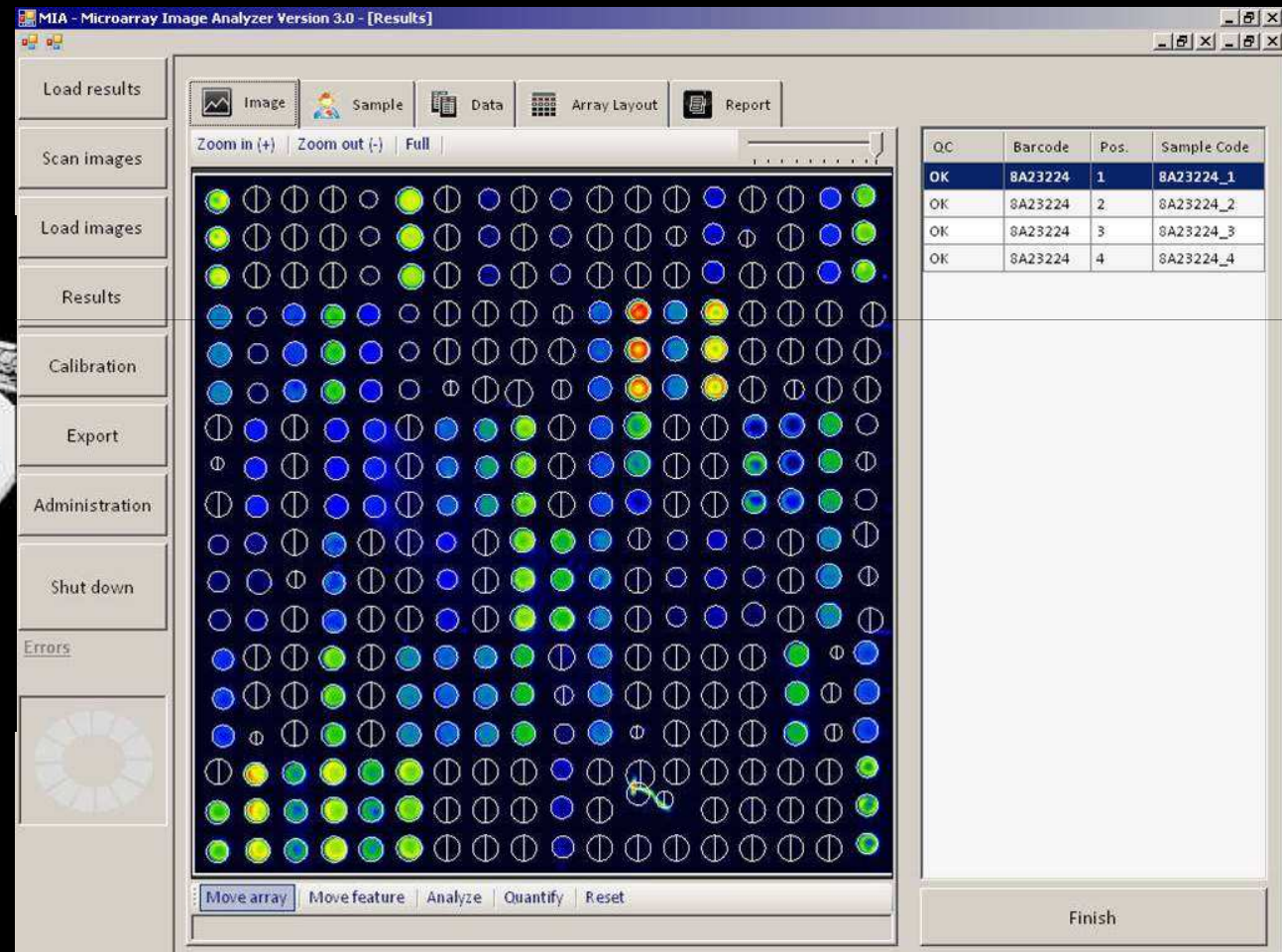
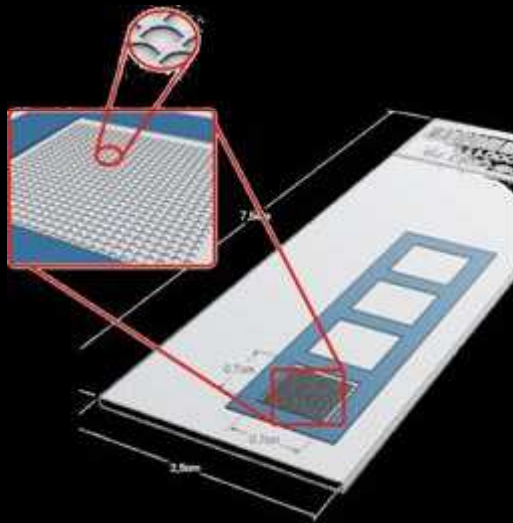
Permite:

Detectar IgE específicas  
para 103 alérgenos  
recombinantes diferentes  
num só ensaio e com  
apenas 20 µL soro



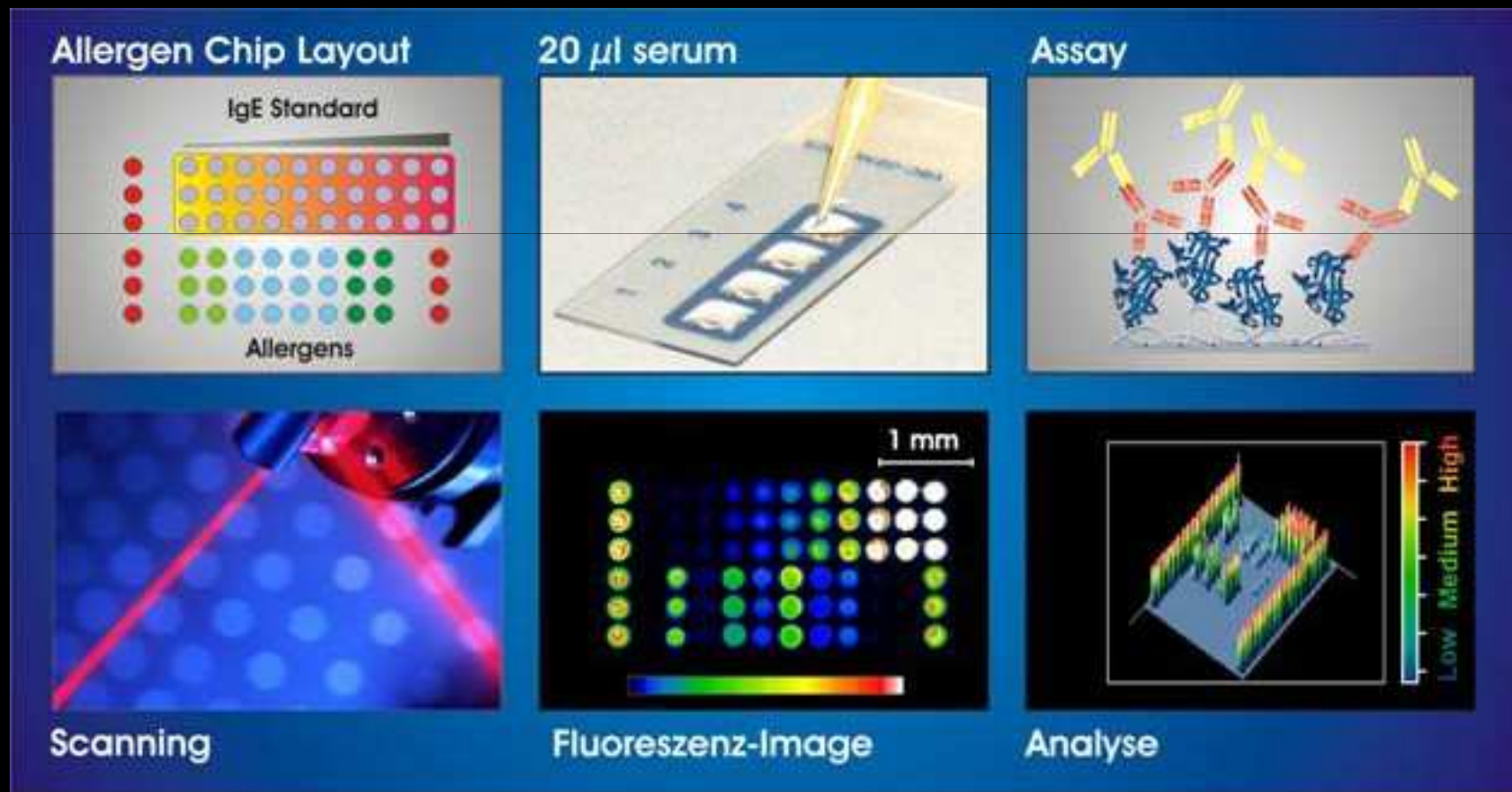
# Microarrays e CRD

- ISAC (Immuno Solid-phase Allergy Chip)



# Microarrays e CRD

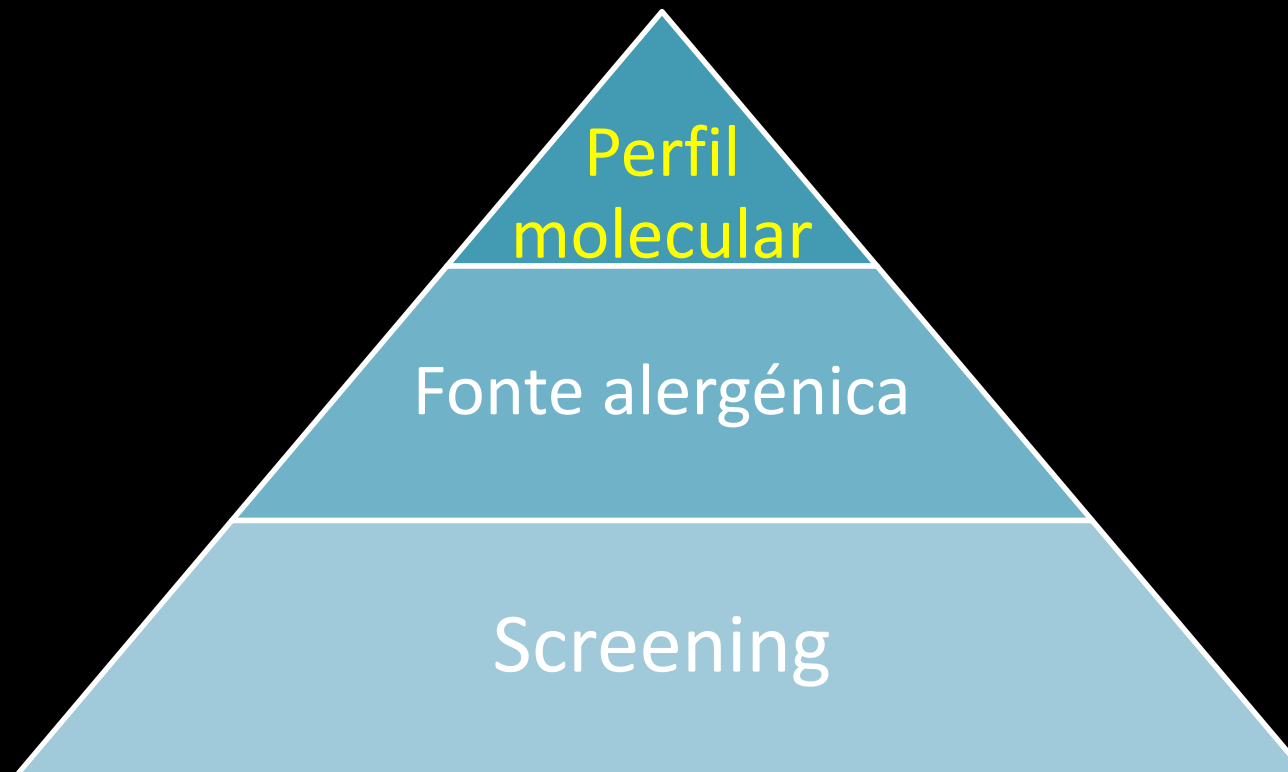
- ISAC (Immuno Solid-phase Allergy Chip)



# Microarrays e CRD

- Níveis no diagnóstico IgE:

CRD (Component Resolved Diagnosis)



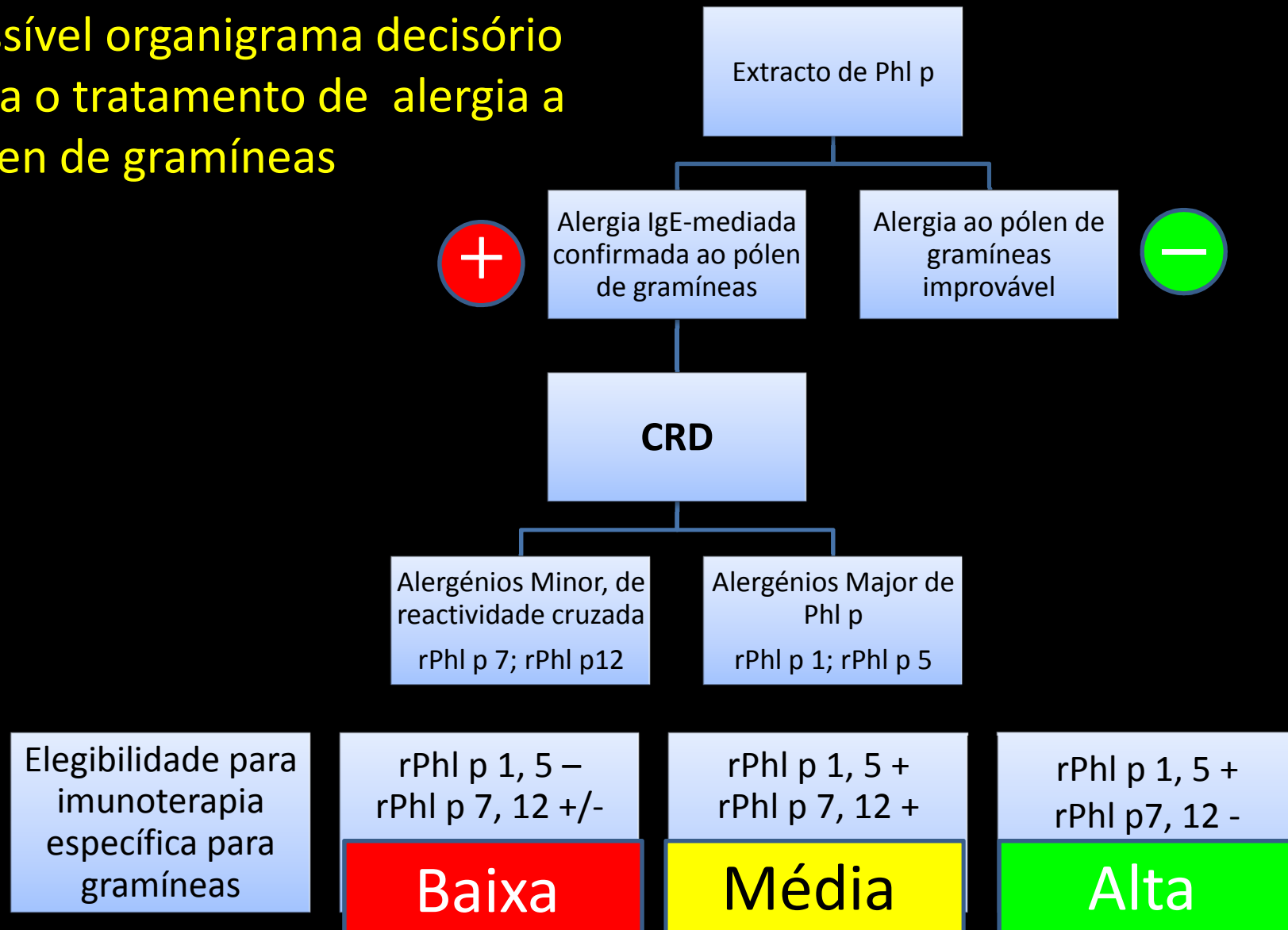
# Microarrays e CRD

## CRD (Component Resolved Diagnosis)

- Maior sensibilidade dos testes
- Diagnóstico diferencial
- Melhor selecção dos pacientes para imunoterapia
- Imunoterapia à medida...
- Previsão de reactividade cruzada
- Prognóstico
- Futuro

# CRD (Component Resolved Diagnosis)

Possível organograma decisório  
para o tratamento de alergia a  
pólen de gramíneas



# Métodos Laboratoriais

## Imunidade Celular

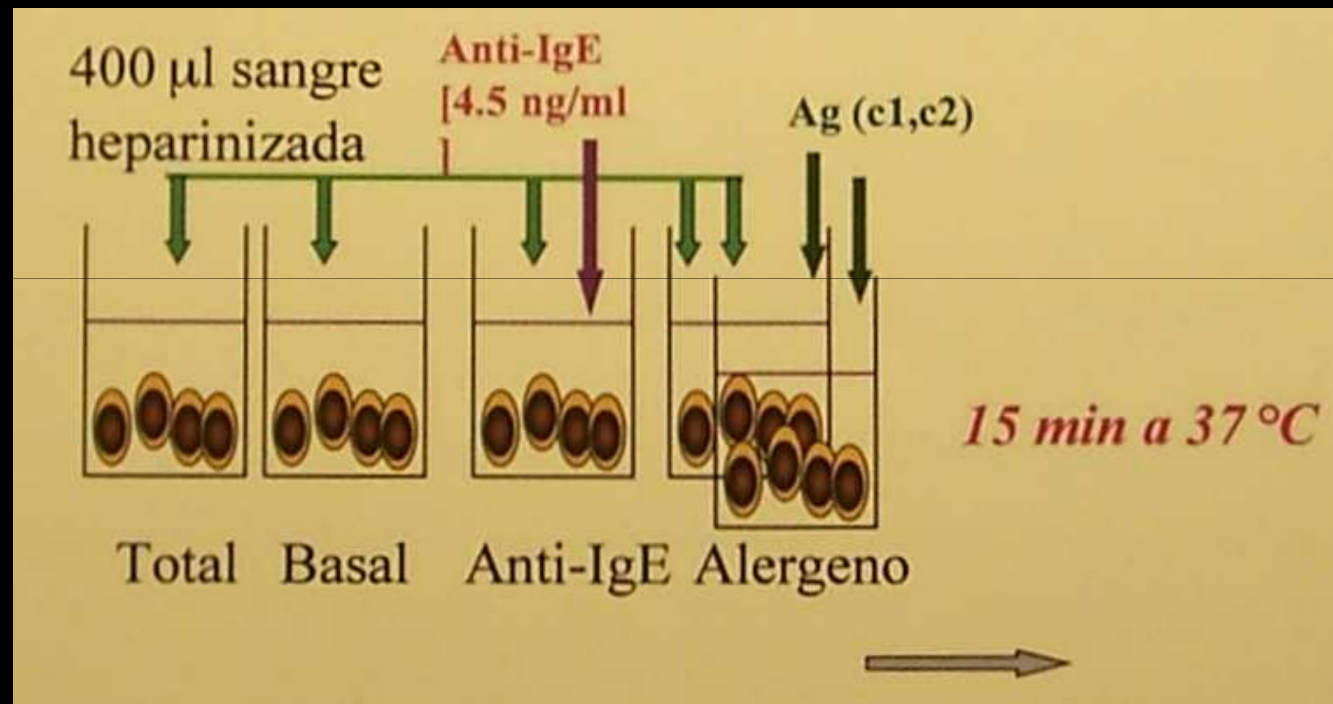


# Teste de libertação de histamina

- Quantificação da libertação de histamina dos basófilos  
→ Estudo *in vitro* de reacções de hipersensibilidade imediata
- A partir do sangue total (basófilos têm o exclusivo da histamina no sangue periférico)
- Reproduz *in vitro* a reacção alérgica  
→ prova de provocação *in vitro*
- Pequeno volume de sangue requerido ( $\cong 0,6 - 1\text{mL}$ )  
→ Método de Fluorimunoensaio capaz de detectar 0,5 a  $>100\text{ ng/mL}$

# Teste de libertação de histamina

## Fase de estimulação



Resultado: % LH induzida pelo antígeno testado

# Teste de libertação de histamina

## Indicações e vantagens

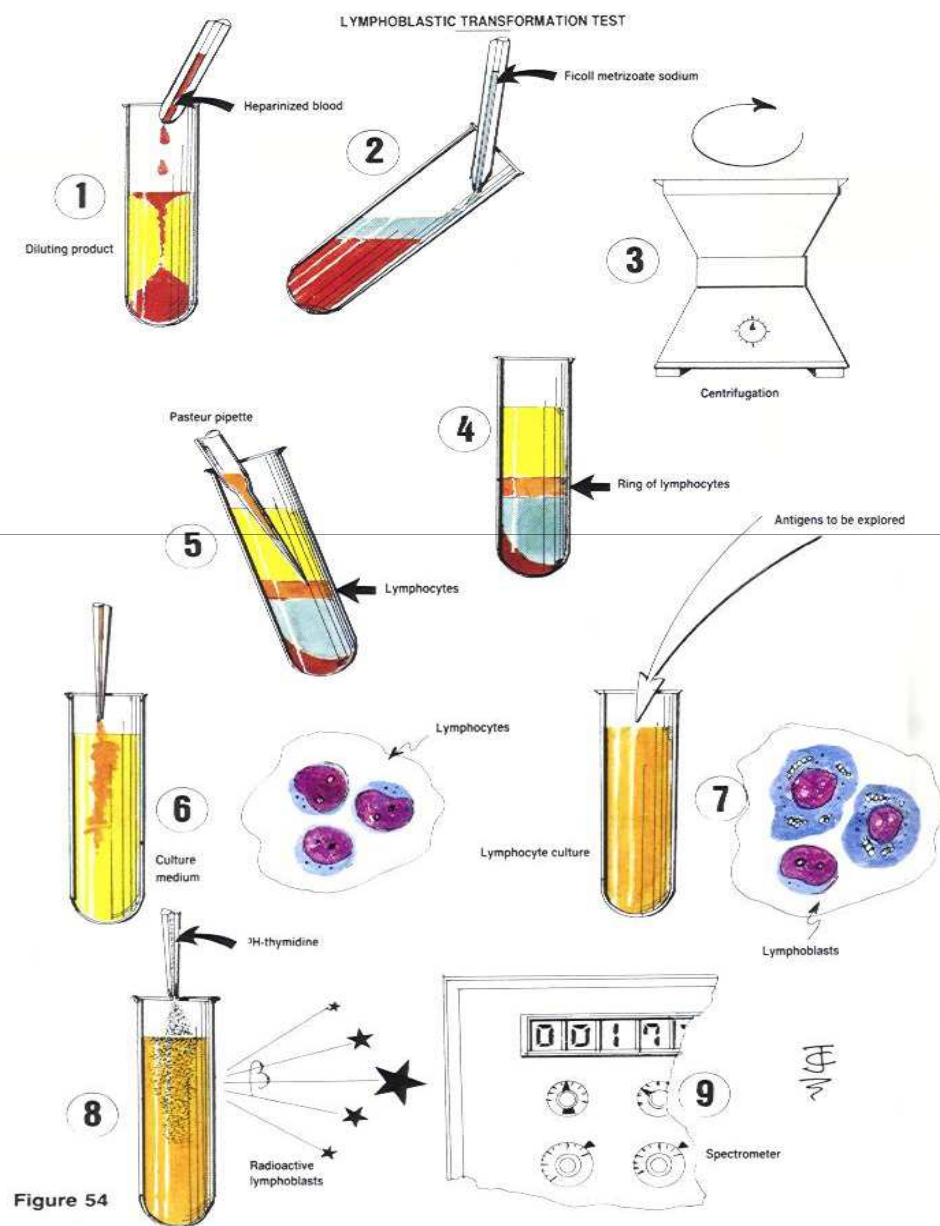
	Sensibilidade	Especificidade
Alergia a inalantes		
Ácaros	87%	84%
Fungos	90%	86%
Alergia alimentar	56%	78%
Conjuntivite alérgica	Elevada	Elevada
Alergia a fármacos	51%	63%

# Teste de libertação de histamina

- Rapidez de realização
- Complementar de métodos como o doseamento de IgE específicas
- Permite avaliar a resposta a alérgenos para os quais não está disponível a determinação da IgE específica
- Permite avaliar o efeito da terapêutica farmacológica, quer *in vitro*, quer *in vivo*
- Útil para diagnóstico em pacientes com alterações cutâneas que impossibilitam a realização das provas cutâneas

# TTL (Teste de transformação linfocitária)

- Linfócitos anteriormente sensibilizados sofrem regressão blástica e proliferam quando expostos, de novo, a esse estímulo antigénico
- Cultura de linfócitos em presença dos antígenos suspeitos
- Avaliação da blastogénese proliferante pela incorporação de  $^3\text{H}$ -timidina
- Vasto campo de aplicação





# TTL (Teste de transformação linfocitária)

- Resultado expresso em CPM das culturas celulares obtidas  
$$IE = \text{CPM células estimuladas} / \text{CPM células não estimuladas}$$
- $IE > 3 \Rightarrow$  Positivo
- Vantagem: > sensibilidade que outros testes de avaliação da hipersensibilidade a fármacos
- Desvantagem: fraca correlação com a clínica

# Imunofenotipagem

- Identificação e caracterização de células em suspensão, de acordo com:

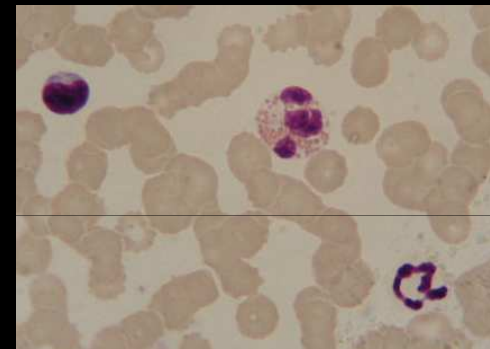
Dimensão

Complexidade ou granularidade celular

Expressão molecular (à superfície e interna)

Sem estimulação prévia

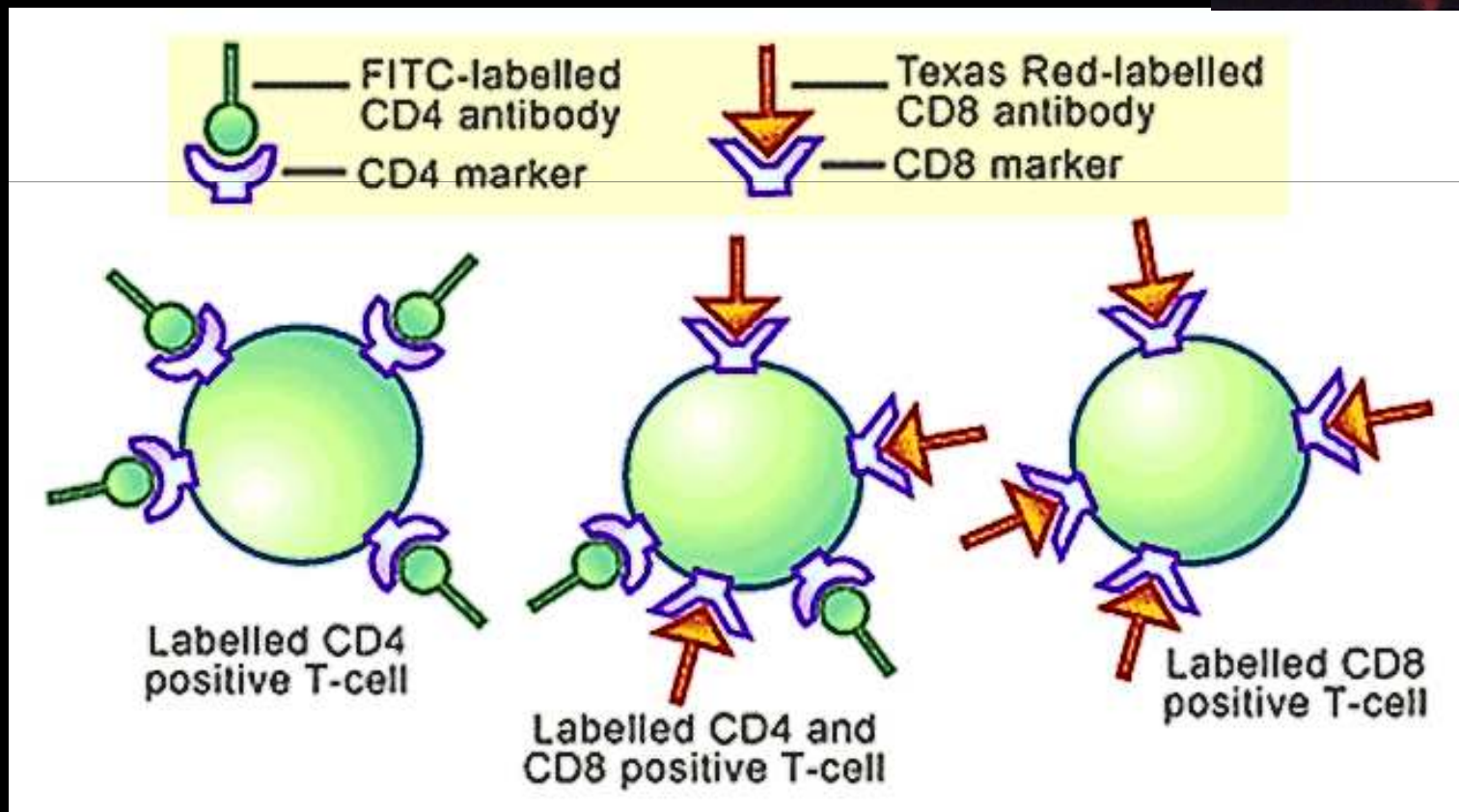
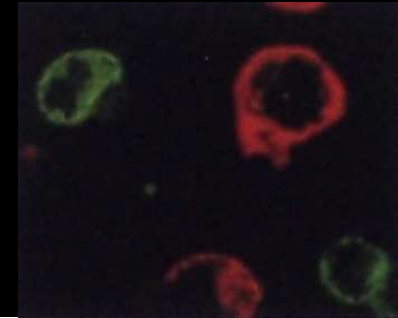
Com estimulação prévia



- Recurso a Ac Mc marcados com fluorocromos
- Método de Citometria de Fluxo

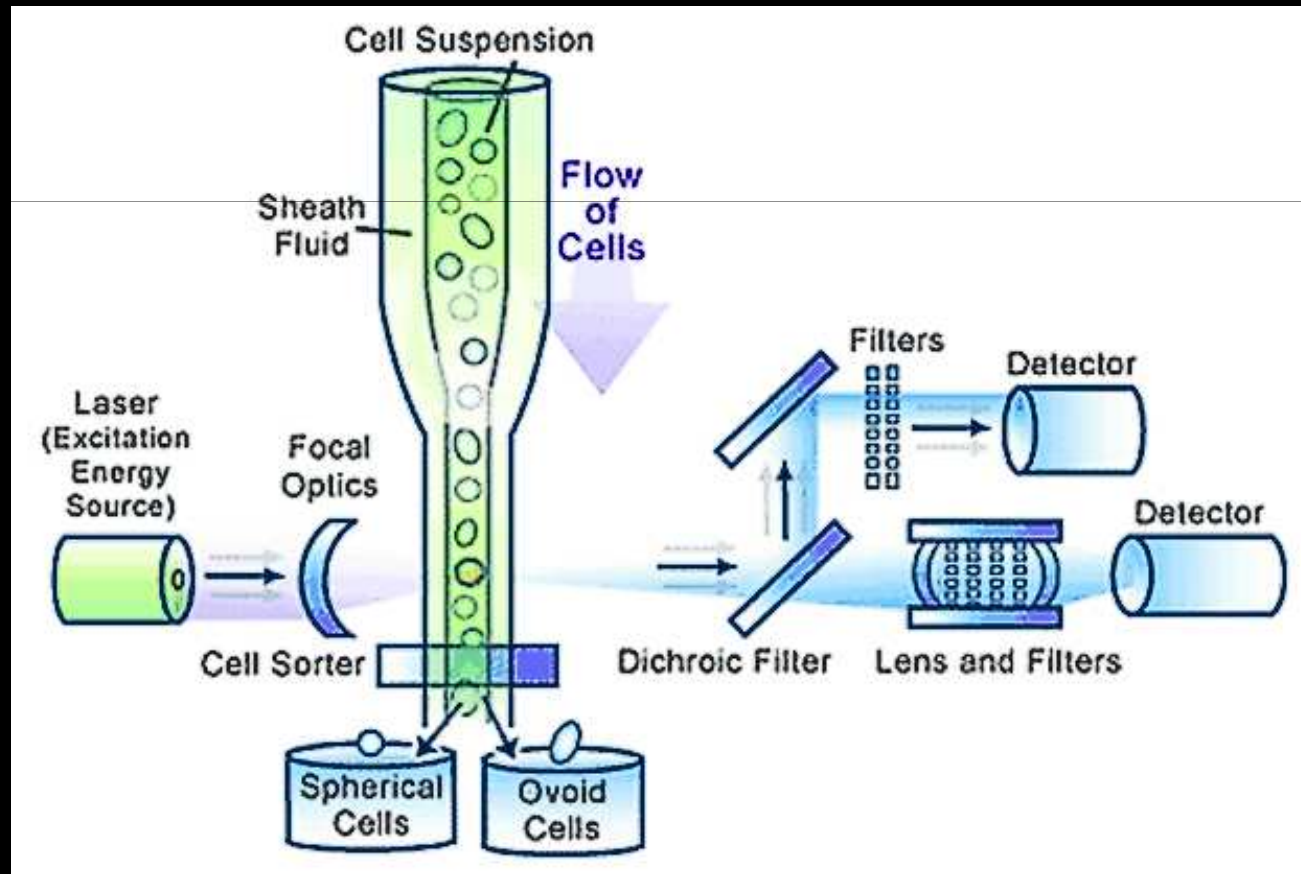
# Imunofenotipagem

## 1º Marcação celular



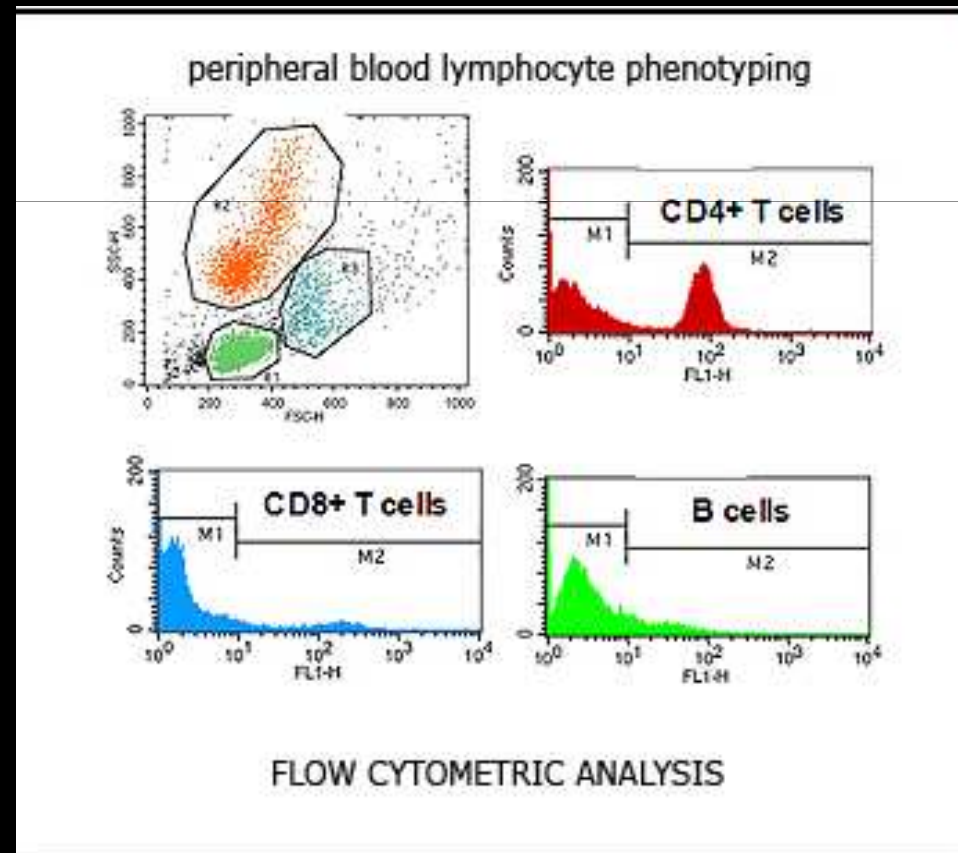
# Imunofenotipagem

## 2º Detecção celular (Aquisição em Citómetro de Fluxo)



# Imunofenotipagem

## 3º Análise computacional dos eventos (células) adquiridos

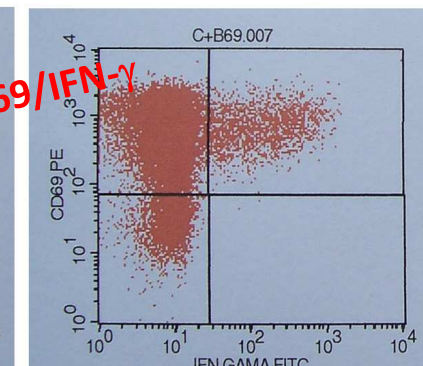
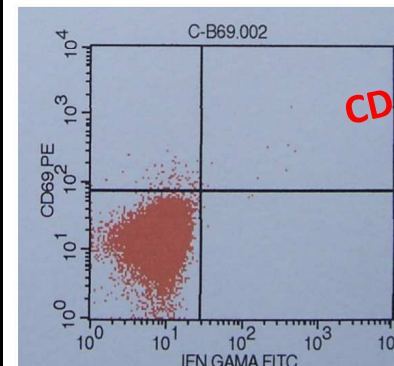
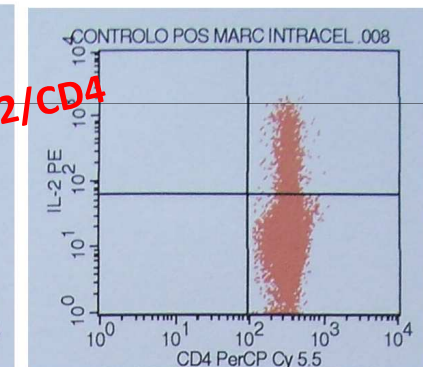
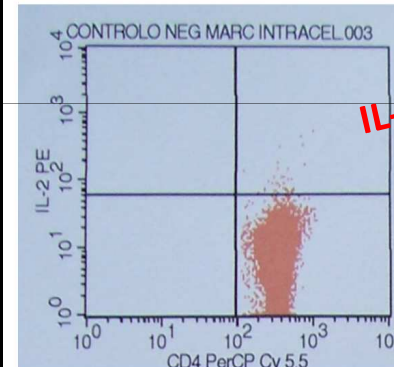
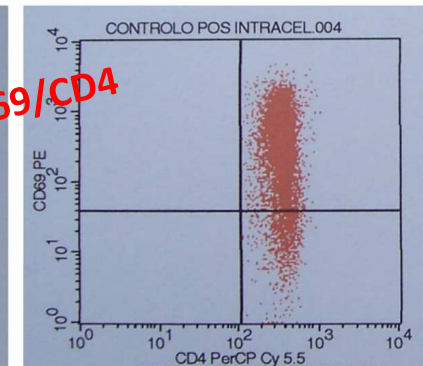
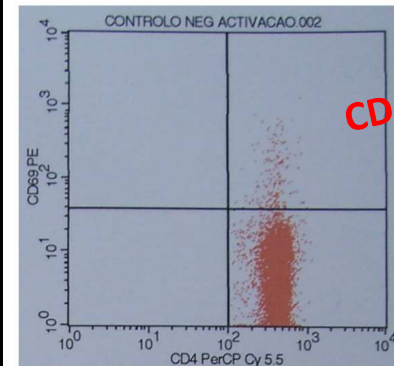


# Imunofenotipagem

3º Análise computacional dos eventos (células) adquiridos

C. Neg.

C. Pos.

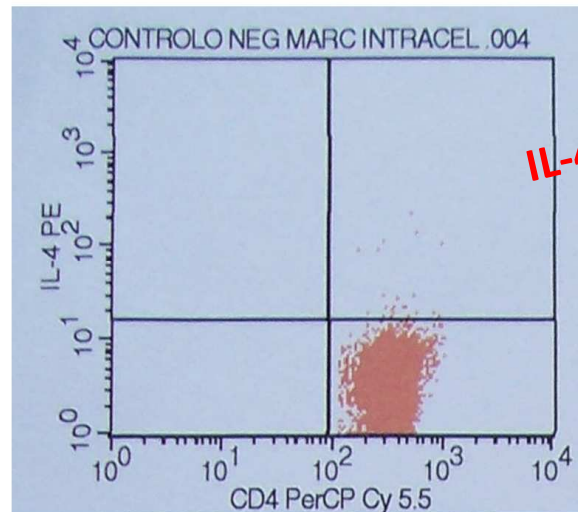




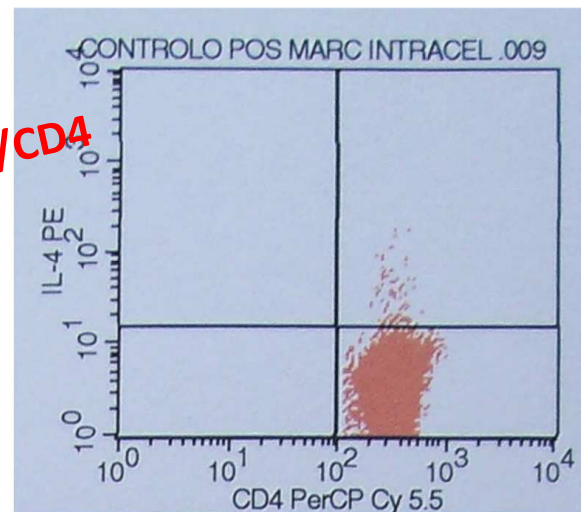
# Imunofenotipagem

3º Análise computacional dos eventos (células) adquiridos

C. Neg.



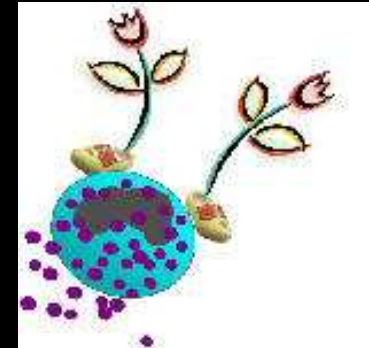
C. Pos.



IL-4/CD4

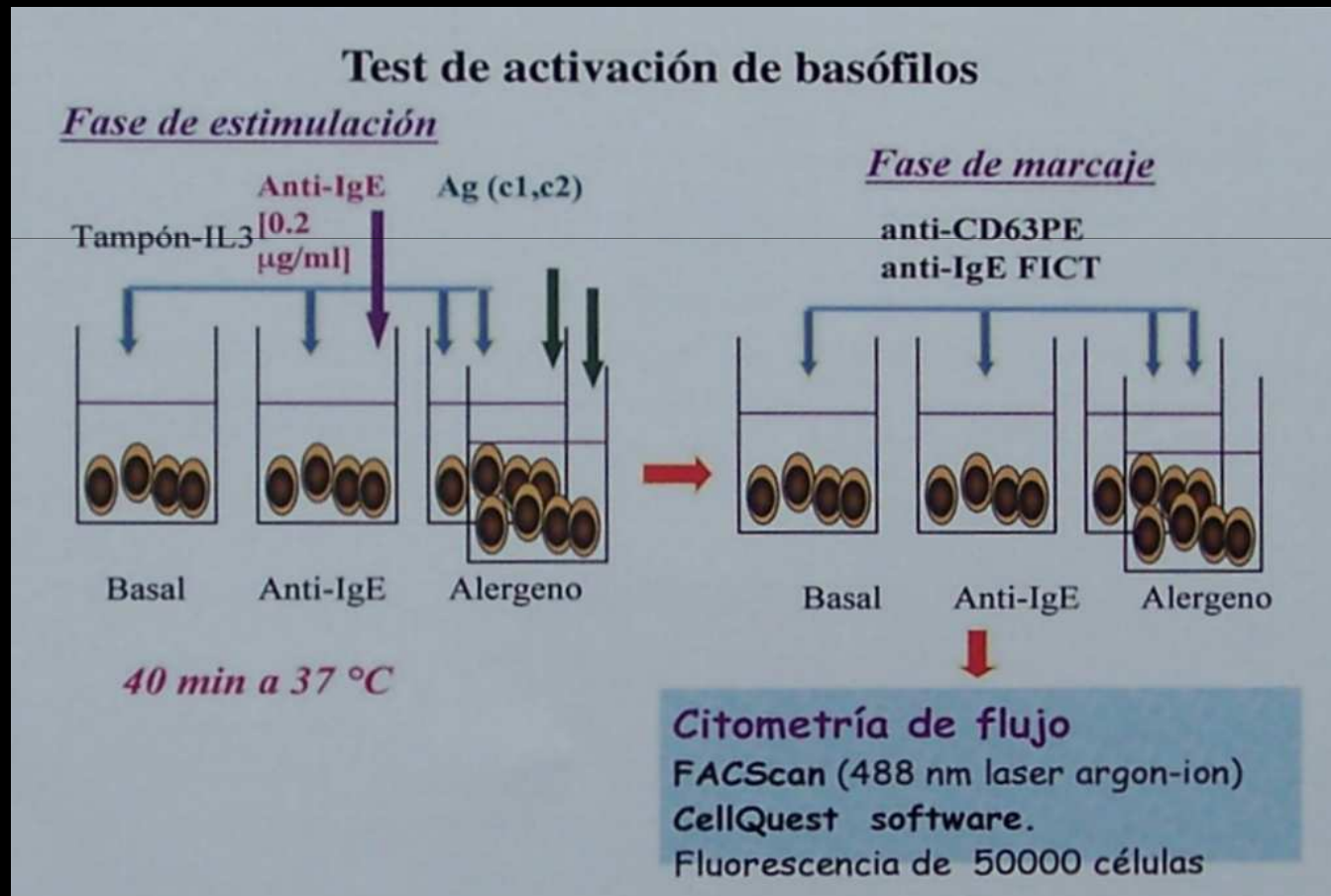
# Teste de activação de basófilos

- Activação antigénio-específica *in vitro* de basófilos
- Aumento da expressão à superfície da célula, da proteína granular CD63
- Por Citometria de Fluxo → Marcação dos basófilos com:
  - Ac Mc anti-IgE – FITC (identifica os basófilos)
  - +
  - Ac Mc anti-CD63 – PE (marca os basófilos activados)



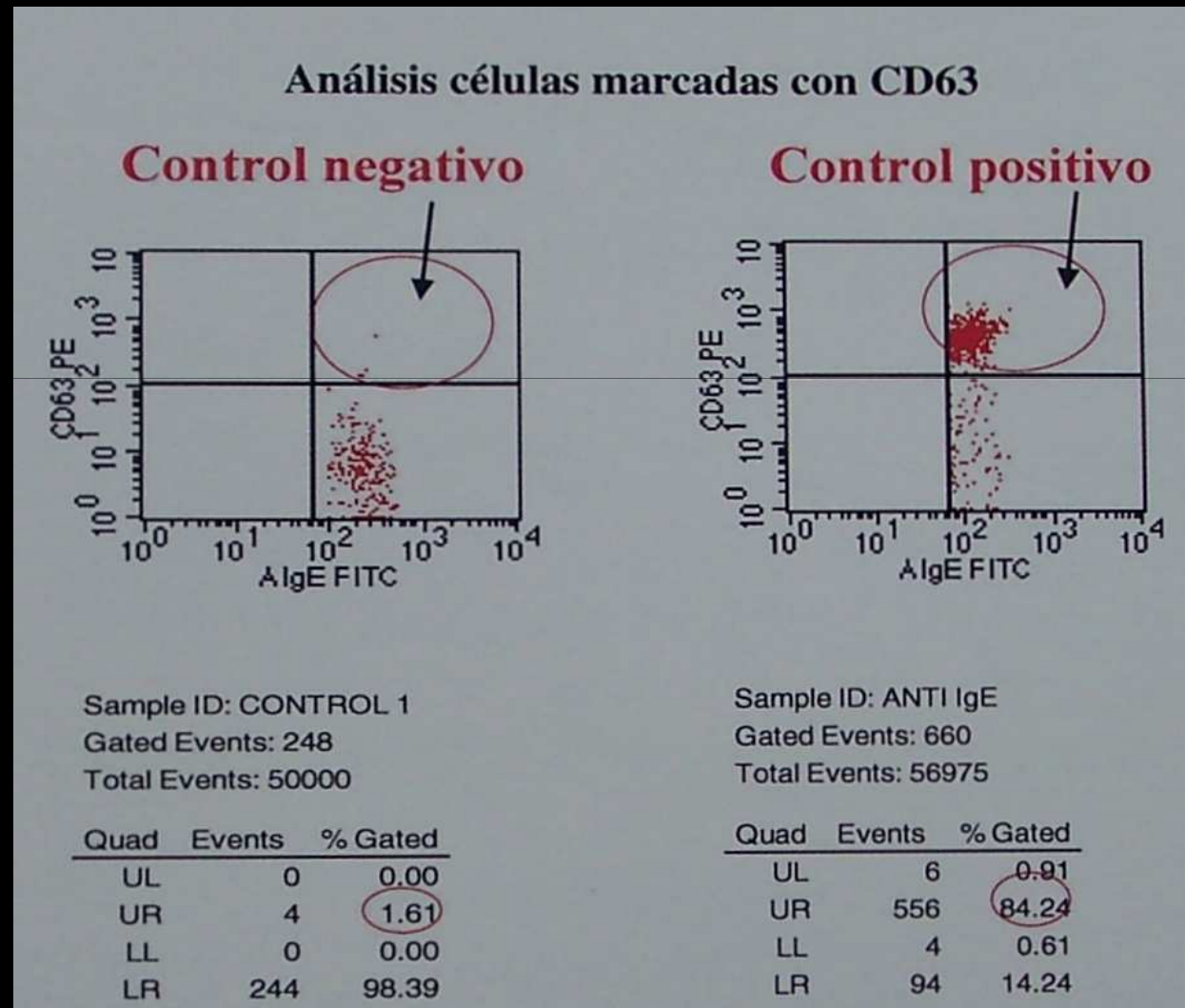
# Teste de activação de basófilos

1º Activação em cultura... 2º Marcação celular... 3º Aquisição



# Teste de activação de basófilos

## 4º Análise computacional

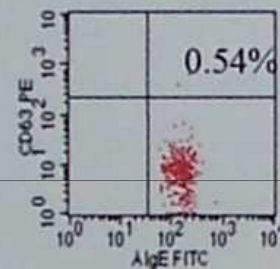


# Teste de activação de basófilos

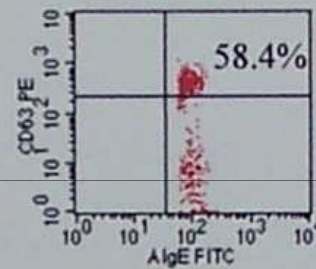
## 4º Análise computacional

### Ejemplos TAB en sensibilización a ácaros

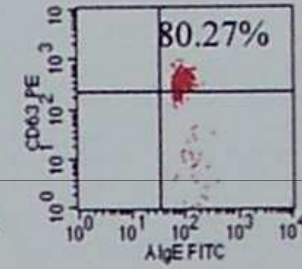
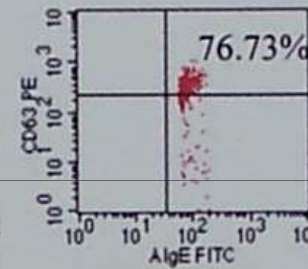
Control



Anti IgE

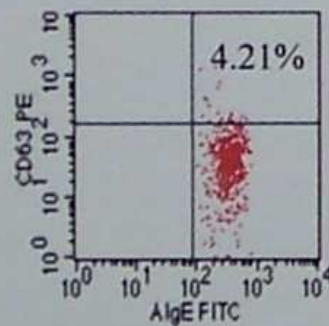


*Derm pt*

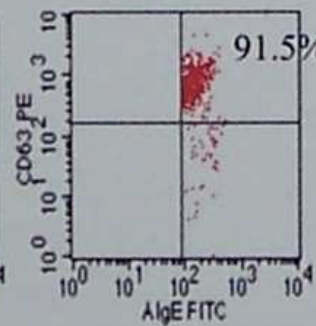


### TAB en Sensibilización a gramíneas

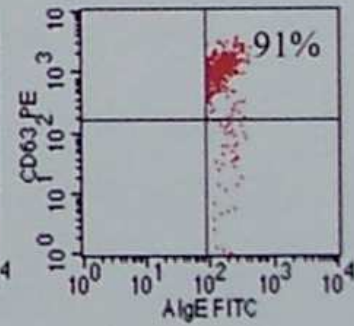
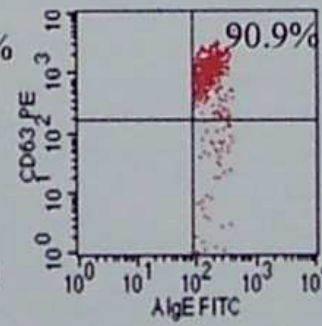
Control



Anti IgE



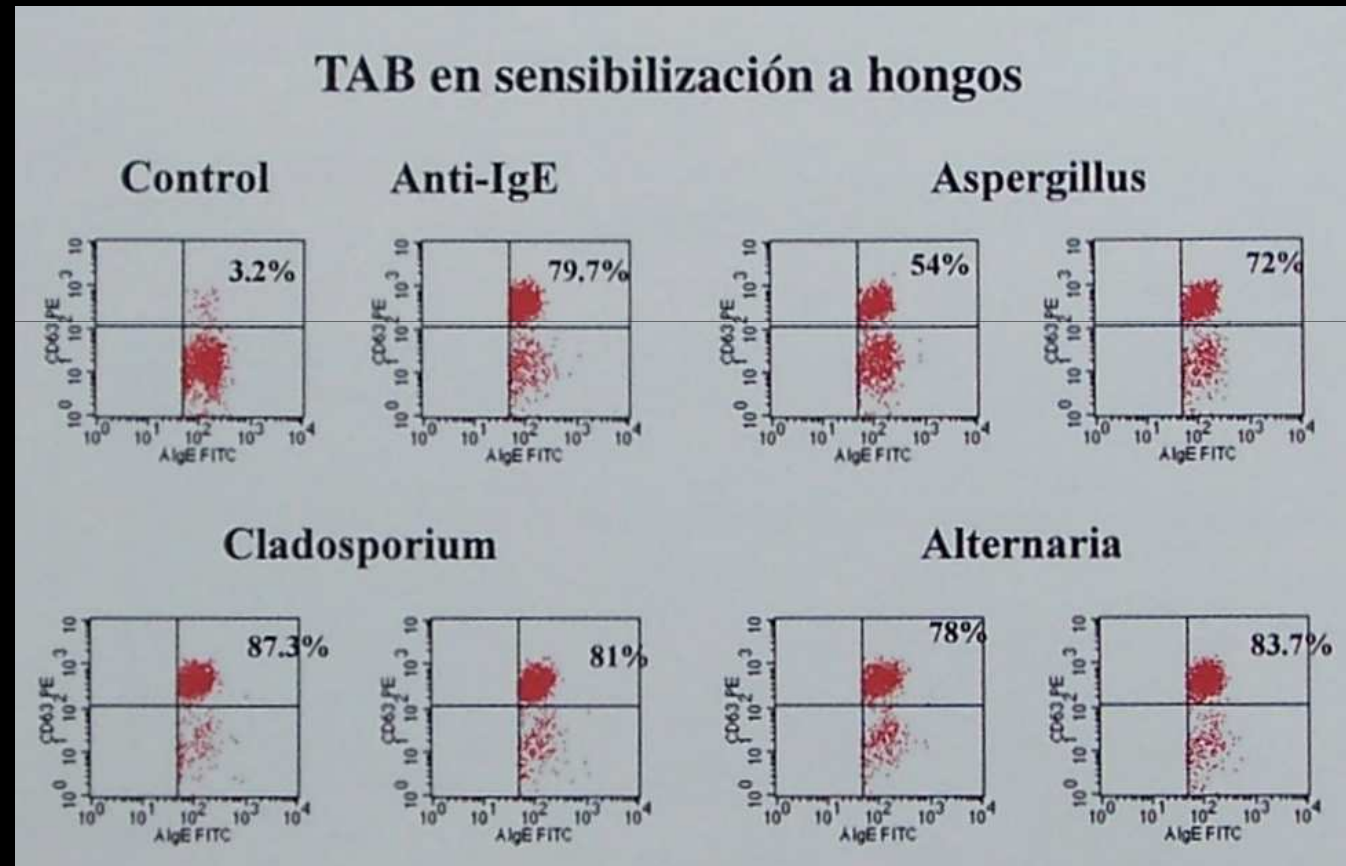
*Lol p*





# Teste de activação de basófilos

## 4ª Análise computacional



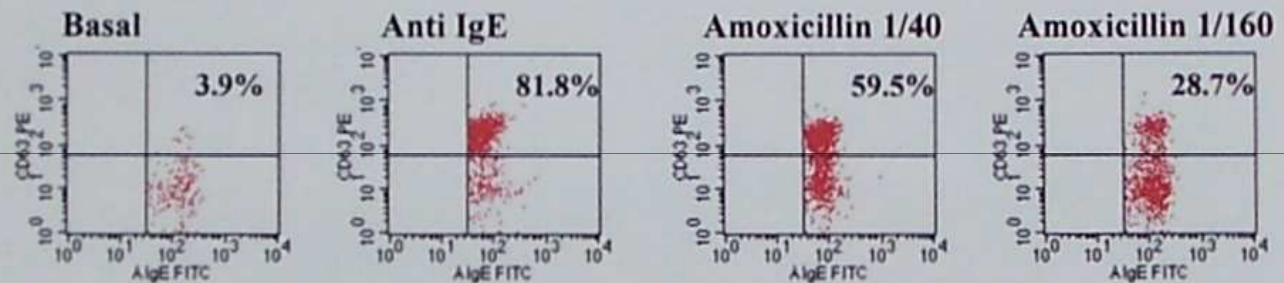


# Teste de activação de basófilos

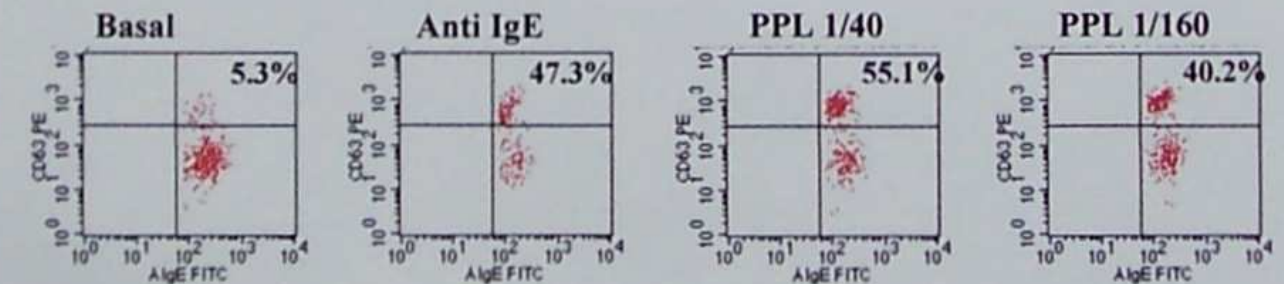
## 4º Análise computacional

### TAB en alergia a beta-lactámicos

#### Ejemplo nº1



#### Ejemplo nº2



# Teste de activação de basófilos

## Desempenho do método

	Inalantes	Alimentos	Beta-lactâmicos	Metabizol	Látex
Sensibilidade	93,30%	82,30%	50%	42,30%	93%
Especificidade	98%	63%	93,30%	100%	100%
<i>n</i>	105	54	58	26	43